

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



<p>(51) Internationale Patentklassifikation 5 : C12Q 1/68, B01D 57/02 G01N 27/26</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 91/02815 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 7. März 1991 (07.03.91)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP90/01366 (22) Internationales Anmeldedatum: 18. August 1990 (18.08.90) (30) Prioritätsdaten: P 39 27 467.5 19. August 1989 (19.08.89) DE P 40 06 974.5 6. März 1990 (06.03.90) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DIA- GEN INSTITUT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK GMBH [DE/DE]; Niederheider Straße 3, D-4000 Düsseldorf 13 (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : HENCO, Karsten [DE/ DE]; Schlickumer Weg 23, D-4006 Erkrath 2 (DE). RIESNER, Detlev [DE/DE]; Eichenwand 15, D-4000 Düsseldorf 12 (DE). STEGER, Gerhard [DE/DE]; Opladener Straße 102, D-4000 Düsseldorf 1 (DE).</p>	<p>(74) Anwälte: WERNER, Hans-Karsten usw. ; Deichmann- haus am Hauptbahnhof, D-5000 Köln 1 (DE). (81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (euro- päisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (euro- päisches Patent)*, DK (europäisches Patent), ES (euro- päisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (euro- päisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (euro- päisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäi- sches Patent), US.</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>	
<p>(54) Title: PROCESS AND DEVICE FOR SEPARATING AND DETECTING CONSTITUENTS OF A MIXTURE OF SUBSTANCES BY TEMPERATURE GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS (54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR TRENNUNG UND DETEKTION VON KOMPONENTEN EINES STOFFGEMISCHES DURCH TEMPERATURGRADIENTEN-GELELEKTROPHORESE (57) Abstract In a process for separating and detecting constituents of a mixture of substances by temperature gradient gel electrophore- sis (TGGE), a spatial temperature gradient is constructed from spatially separate temperature levels, or a temporal temperature gradient is constructed, or a temperature gradient is constructed from the spatial and temporal temperature gradients. The tem- perature levels used to construct the spatial temperature gradients are set by controllable heating or cooling devices. For the con- struction of the temporal temperature gradients, the temperature level at any point in the separating section in the separating me- dium can be varied with time as desired by means of controllable heating or cooling devices. A device for implementing the process with controllable heating or cooling devices for constructing temperature gradients, a hollow body arranged between the temperature levels which contains the separating medium used, and a thermostatted jacket which surrounds the hollow, are also described. (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Trennung und Detektion von Komponenten eines Stoffgemisches durch Tempera- turgradienten-Gelelektrophorese (TGGE), wobei entweder ein räumlicher Temperaturgradient durch räumlich voneinander ent- fernte Temperaturniveaus oder ein zeitlicher Temperaturgradient oder ein Temperaturgradient durch Kombination des räumli- chen und zeitlichen Temperaturgradienten aufgebaut wird. Die Temperaturniveaus zum Aufbau des räumlichen Temperaturgra- dienten werden durch regelbare Heiz- oder Kühlvorrichtungen eingestellt. Zum Aufbau des zeitlichen Temperaturgradienten ist an jedem Ort der Trennstrecke in dem Trennmedium das Temperaturniveau in zeitlicher Abhängigkeit mittels regelbarer Heiz- oder Kühlvorrichtungen frei wählbar einstellbar. Eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens mit regelbaren Heiz- oder Kühlvorrichtungen zum Aufbau von Temperaturgradienten einem zwischen den Temperaturniveaus angeordneten Hohlkörper enthaltend das zur Trennung verwendete Medium und einem Thermostatiertmantel, der den Hohlkörper umschließt, wird be- schrieben.</p>		

BENENNUNGEN VON "DE"

Bis auf weiteres hat jede Benennung von "DE" in einer internationalen Anmeldung, deren internationaler Anmeldetag vor dem 3. Oktober 1990 liegt, Wirkung im Gebiet der Bundesrepublik Deutschland mit Ausnahme des Gebietes der früheren DDR.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	ES	Spanien	MG	Madagaskar
AU	Australien	FI	Finnland	ML	Mali
BB	Barbados	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BE	Belgien	GA	Gabon	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BJ	Benin	HU	Ungarn	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	RO	Rumänien
CA	Kanada	JP	Japan	SD	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CG	Kongo	KR	Republik Korea	SN	Senegal
CH	Schweiz	LJ	Liechtenstein	SU	Sowjet Union
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
DE	Deutschland	LU	Luxemburg	TG	Togo
DK	Dänemark	MC	Monaco	OUS	Vereinigte Staaten von Amerika

Verfahren und Vorrichtung zur Trennung und Detektion von
Komponenten eines Stoffgemisches durch Temperatur-
gradienten-Gelelektrophorese

5 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Trennung und Detektion von Komponenten eines Stoffgemisches durch Temperaturgradienten-Gelelektrophorese (TGGE), insbesondere ein Verfahren zur Detektion von
10 Mutationen von Nukleinsäurefragmenten durch Analyse des durch Hybridisierung des die Mutation aufweisenden Nukleinsäurefragments (Mutante) mit dem diese Mutation nicht aufweisenden Nukleinsäurefragments (Wildtyp) ge-
15 wonnenen Heteroduplexes, ein Verfahren zur Probenaufbereitung unter Verwendung eines Oligonukleotids sowie dieses Oligonukleotid selbst, sowie eine Vorrichtung zur Durchführung der Temperaturgradienten-Gelelektrophorese.

20 Der Nachweis von Mutationen in genetischem Material oder der Nachweis der phänotypischen Konsequenz einer genetischen Mutation ist eine wichtige analytische Aufgabe in vielen Bereichen biologischer Forschung, angewandter Medizin, biotechnischer Produktion und Kriminalistik. Auf genetischer Ebene bedeutet eine Mutation den Aus-
25 tausch mindestens eines Nukleotides oder Basenpaares auf DNA- oder RNA-Ebene. Die Möglichkeiten des sogenannten "genetic engineering" erlauben mit Hybridisierungs- oder Sequenzierungstechniken den Nachweis einer Mutation in klonaler DNA oder RNA. Diese Techniken beschränken sich
30 jedoch auf forschungsnahe Anwendungen. Für den Routineeinsatz konnte ein technischer Standard, der dem Vergleich mit immunologischen Methoden (ELISA usw.) standhält, nicht erreicht werden.

Die Temperaturgradienten-Gelelektrophorese (TGGE), wie sie in der DE-OS 36 22 591 beschrieben wurde, ist eine Methode zur Detektion geringer struktureller Unterschiede oder Besonderheiten biologischer Makromoleküle wie

Nukleinsäuren oder Proteine. Die Technik ist jedoch ungeeignet für eine automatisierbare Analyse, wie sie zum Beispiel bei Bestimmung vieler Einzelproben im klinischen Bereich bei der Analyse genetischer Erkrankungen oder in der forensischen Analytik notwendig ist. Mit Hilfe der TGGE-Technologie gelang es, Mutationen ohne umständliche differentielle Hybridisierung direkt sichtbar zu machen (Riesner et al. (1989), Electrophoresis 10, S. 377-389), jedoch beschränkt sich die Technik auf die Handhabung einer Flachbett-Gelelektrophorese für die forschungsmäßige Analytik. Ähnliche Resultate liefert die Kombination aus Flachbett-Gelelektrophorese und einem denaturierenden chemischen Gradienten, der sich aber kaum reproduzierbar formen läßt und somit für eine Automatisierung nicht in Frage kommt.

Die notwendige Voraussetzung für die empfindliche Erfassung selbst einzelner Mutationen in der TGGE ist ein homogenes Temperaturniveau im Gel senkrecht zur Laufrichtung der Elektrophorese, d.h. an Orten gleichen elektrischen Potentials. Dies kann zum Beispiel durch die doppelseitig temperierte senkrechte Elektrophorese nach D.R. Thatcher und B. Hodson (1981), Biochemistry 197, S. 105-109, nicht hinreichend realisiert werden, da die thermisch nicht ausreichend verbundenen gegenüberliegenden Thermostatierplatten an Orten gleichen elektrischen Potentials nicht identische Temperaturen aufweisen.

Das Erscheinungsbild der belebten Natur ist auf genetischer Ebene in Form der Nukleinsäuren programmiert, bestehend entweder aus RNA- oder DNA-Kettenmolekülen. Veränderungen der genetischen Information werden als Mutationen bezeichnet und sind die Basis für evolutionäre Entwicklungen, für genetisch bedingte Erkrankungen und andere genetisch bedingte biologische Eigenschaften

eines Virus d r Organismus. Die Mehrzahl der erfolgten Mutationen ist für das System ohne erkennbare Auswirkung. Solche Mutationen werden als neutral bezeichnet.

5 Seit Einführung gentechnologischer Techniken ist es möglich geworden, eine Mutation zu entdecken, ihre zeitliche Entstehung zu bestimmen und ihren Einfluß auf eine biologische Funktion zu messen.

10 Mit der Methode der vergleichenden Sequenzanalyse (Sequenzierung) von homologen Sequenzen wird eine Mutation erkennbar. Unter dem Begriff Mutation wird ein einzelner Nukleotid austausch, eine Deletion oder eine Insertion
15 einzelner bis vieler Nukleotide oder eine Umordnung von Kettensegmenten verstanden. Die Sequenzanalyse ist trotz großer Fortschritte in den letzten Jahren nach wie vor eine aufwendige Technik, unterstützt von kostspieligen Apparaturen und für Reihenanalysen ungeeignet. Lediglich die Suche nach an sich bekannten Mutationen, wie sie für
20 bestimmte Erberkrankungen, zum Beispiel alpha-1-Antitrypsin-Defizienz (Kidd, U.J., Wallace, R.B., Hakura, K. u. Woo, S.L.C. (1983), Nature 304, 230-234) beschrieben sind, hat sich technisch durch die Verwendung synthetischer Oligonukleotidsonden vereinfacht. Eine Anzahl
25 von Fragestellungen entzieht sich jedoch nahezu vollständig dem experimentellen Zugriff, wie zum Beispiel die Suche nach unbekannten Mutationen auf langen Gensegmenten, die nicht mit Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP) verknüpft sind, oder Reihenuntersuchungen, die für die medizinische Genetik, Populationsanalysen, evolutionäre Verwandtschaftsanalysen, Virusvariantenanalysen usw. von Bedeutung sind.
30

Nukleinsäureketten (RNA und DNA) haben die Fähigkeit, mit sogenannten Komplementärsequenzen Doppelstrangstrukturen auszubilden. Es entstehen dabei DNA/DNA, RNA/RNA und DNA/RNA Doppelstrangstrukturen. Eine charakteristi-

sche Eigenschaft dieser Strukturen ist ein temperaturabhängiges Denaturieren (Schmelzen) der Doppelstränge. Das Schmelzen geschieht in einem sehr engen Temperaturintervall, d.h. es denaturieren große Abschnitte der Doppelstrangstruktur in einem einstufigen Prozeß. Es handelt sich somit um hochkooperativ ablaufende physikalische Reaktionen. Der Verlust der durchgängigen Doppelstrangstruktur äußert sich in einer veränderten Mobilität (meist ein Mobilitätsverlust) der betroffenen Nukleinsäure. Dieser Mobilitätsverlust kann in einem elektrophoretischen Trennverfahren ausgenutzt werden, um Nukleinsäuren verschiedener Schmelztemperaturen zu trennen. So wandern thermodynamisch instabilere Nukleinsäuren langsamer und somit weniger weit als solche mit stabilen Strukturen. Das zur Trennung verwendete Medium muß dabei einen Denaturierungsgradienten aufweisen, beispielsweise durch steigende Konzentration eines denaturierenden Agens. Die Stabilität der internen Bereiche der Basenpaare ist abhängig vom G/C-Gehalt sowie der Sequenz. Diese Effekte sind ausführlich untersucht worden (Meinkoth, S. u. Wahl, G. (1984), Analytical Biochem. 138, 267-284).

Führt die Mutation nun zu hinreichend großen Veränderungen in dem entsprechenden Bereich, so wird die mutierte Nukleinsäure ein anderes Schmelzverhalten aufweisen als die nicht mutierte. Häufig ist eine Mutation nur durch den Austausch eines Basenpaares gegen ein anderes Basenpaar gekennzeichnet (Transversion oder Transition). Daher ist der mutierte Nukleinsäurestrang in sich recht stabil und schmilzt in der Regel bei ähnlichen Temperaturen wie die nicht mutierte Form, so daß eine Diskriminierung nicht möglich ist. Solche Mutationen werden jedoch sichtbar, indem die mutierte Nukleinsäure mit einer Nukleinsäure, welche diese Mutation nicht aufweist (Wildtyp), in vergleichbaren Konzentrationen gemischt, bis

einschließlich der Strangtrennung denaturiert und danach wieder renaturiert wird. Dadurch entstehen alle Kombinationen der entsprechenden Nukleinsäure-Einzelstränge, unter anderem auch sogenannte Heteroduplices aus mutiertem Einzelstrang und nicht mutiertem Einzelstrang. Da in den Heteroduplices nun dem jeweiligen Nukleotid an der Stelle der Mutation das komplementäre Nukleotid fehlt, kommt es an diesen Positionen zu merklichen Destabilisierungen in den benachbarten Doppelhelix-Regionen. Die Heteroduplices werden dementsprechend eher aufschmelzen als die Duplices des Wildtyps oder der Mutante.

Nachteilig an den bislang bestehenden Verfahren sind die relativ umständliche Handhabung sowie die nicht immer sicher zu gewährleistende Aufspürung der vermuteten Mutationen.

Das der Erfindung zugrunde technische Problem ist somit einmal, ein Verfahren bereitzustellen, das die Nachteile der Undurchführbarkeit der TGGE für den analytischen Routinebetrieb beseitigt und die TGGE insgesamt leichter handhabbar macht. Weiterhin soll eine Vorrichtung bereitgestellt werden, die eine automatische Auswertung der TGGE ermöglicht. Die Vorrichtung soll auch die simultane Analyse von strukturell stark variierenden Nukleinsäuren ermöglichen. Ein weiteres technisches Problem ist die Verbesserung der Aufspürung, insbesondere die quantitative und/oder qualitative Erfassung, von Mutationen und/oder Genvarianten. Die Verbesserung soll in einer bestimmten Ausführungsform auch eine einfachere und sicherere Probenvorbereitung gewährleisten.

Diese technischen Probleme werden durch ein Verfahren gemäß dem kennzeichnenden Teil des Anspruchs 1 gelöst, indem entweder

- ein räumlicher Temperaturgradient in Richtung des zur Trennung verwendeten elektrischen Feldes durch mindestens zwei räumlich voneinander entfernte Temperaturniveaus aufgebaut wird oder
- ein zeitlicher Temperaturgradient durch zeitliche Variation der Temperatur eines Temperaturniveaus aufgebaut wird oder
- ein Temperaturgradient durch Kombination des räumlichen und zeitlichen Temperaturgradienten aufgebaut wird,
- der Temperaturgradient leitend in die Gelmatrix übertragen wird,
- die Temperaturniveaus zum Aufbau des räumlichen Temperaturgradienten durch regelbare Heiz- oder Kühlvorrichtungen eingestellt werden, wobei Orte gleichen elektrischen Potentials identische Temperaturen aufweisen, oder
- zum Aufbau des zeitlichen Temperaturgradienten an jedem Ort der Trennstrecke in dem Trennmedium das Temperaturniveau in zeitlicher Abhängigkeit mittels einer oder mehrerer regelbarer Heiz- oder Kühlvorrichtungen frei wählbar einstellbar ist und ggf.
- am Ende der Trennstrecke die getrennten Komponenten detektiert werden.

Vorteilhafte Ausgestaltungen des erfindungsgemäßen Verfahrens sind in den Unteransprüchen beschrieben. Der Verfahrensanspruch 12 betrifft eine bevorzugte Ausführungsform, wobei die Detektion von Mutationen von Nukleinsäuren quantitativ und qualitativ durchgeführt werden kann, und zwar durch Analyse des durch Hybridisierung des die Mutation aufweisenden Nukleinsäurefragments (Mutante) mit dem diese Mutation nicht aufweisenden Nukleinsäurefragment (Wildtyp) gewonnenen Heteroduplexes, wobei das die Mutation tragende, zu untersuchende Nukleinsäurefragment gewählt wird, daß die Mutation in einer

thermodynamisch instabilen Region des Heteroduplexes liegt. Die darauf rückbezogenen Ansprüche 13 bis 36 betreffen bevorzugte Ausführungsformen dieses Verfahrens.

5

Die Verfahrensansprüche 47 bis 50 betreffen bestimmte Ausführungsformen der quantitativen Detektion, durch welche eine quantitative Analyse von Nukleinsäuren ermöglicht wird. Die Unteransprüche 48 bis 50 betreffen bevorzugte Ausführungsformen dieses Verfahrens.

10

Der Vorrichtungsanspruch 51 beschreibt eine Vorrichtung zur Durchführung der der Temperaturgradienten-Gelelektrophorese (TGGE), dadurch gekennzeichnet, daß zwischen mindestens zwei einen Temperaturgradienten aufbauenden Heiz- oder Kühlvorrichtungen (1, 2) mit Wärmereservoir (4, 5), bei mehr als zwei Heiz- oder Kühlvorrichtungen zwischen den entferntesten Heiz- oder Kühlvorrichtungen ein Hohlkörper (6), der die Heiz- oder Kühlvorrichtungen durchdringt, angeordnet ist, welcher das zur Trennung verwendete Trennmedium in seinem Lumen enthält, und der Hohlkörper (6) von einem wärmeleitenden Thermostatiermantel (7) umschlossen ist.

15

20

Die Unteransprüche 52 bis 62 betreffen bevorzugte Ausführungsformen der betreffenden Vorrichtung, deren Vorteile sich aus der Beschreibung ergeben.

25

Der räumliche Temperaturgradient des erfindungsgemäßen Verfahrens kann so aufgebaut werden, daß mit einer regelbaren Heiz- oder Kühlvorrichtung auf der Probenseite ein bestimmtes Temperaturniveau eingestellt wird, während das zweite, räumlich getrennte Temperaturniveau durch die Temperatur des Elektrophoresebad es auf der gegenpoligen Seite definiert ist. Diese einfache Verfahrensweise ist dann möglich, wenn das Elektrophoresebad s dimensioniert ist, daß die Temperatur konstant

30

bleibt. Dazu ist ein hinreichend groß dimensioniertes
Elektrophoresebad notwendig. Vorzugsweise wird jedoch
auch hier das zweite Temperaturniveau etwa durch Pel-
5 tierelemente, Heizdrähte oder thermostatierbare Wasser-
bäder regelbar ausgestaltet.

Nach dem Probenauftrag werden die Komponenten des zu
trennenden Stoffgemisches längs des elektrischen Feldes
10 in das Trennmedium hineinwandern. Dabei erreichen sie
das erste Temperaturniveau und erfahren eine Konforma-
tionsumwandlung, die in einer drastischen Reduktion der
Wanderungsgeschwindigkeit resultiert. Dies wird entweder
direkt durch die eingestellte Temperatur erreicht oder
15 in Kombination mit partiell denaturierenden Reagenzien.
Sind die zu trennenden Komponenten beispielsweise Nuklein-
säuren, werden durch die partielle Denaturierung die
Doppelstränge teilweise zu größeren "Loops" aufgeweitet,
die in dem Trennmedium quasi steckenbleiben und der Elek-
20 trophorese nicht mehr folgen können. Wird nun die Tempera-
tur gesenkt, so bilden sich die "Loop"-Regionen in Ab-
hängigkeit ihrer thermodynamischen Stabilität zurück,
wodurch die Mobilität der Nukleinsäuren in dem Trennme-
dium wieder erhöht wird. Die jeweilige Temperatur ist
25 eine Stoffcharakteristik der entsprechenden Nukleinsäure.
Somit gelingt es, die verschiedenen Komponenten in Ab-
hängigkeit der Temperatur zu trennen. Die Moleküle, deren
Mobilität erhöht wurde, wandern durch die Trennstrecke
und können am Zielpol der Elektrophorese detektiert
30 werden.

Es ist ebenfalls möglich, einen Temperaturgradienten mit
steigender Temperatur in Elektrophorese-Richtung auszu-
bilden, in welchem die Moleküle zunächst nach ihrem
thermodynamisch partiellen Aufschmelzverhalten in dem
Trennmedium getrennt werden. Bei tieferer Temperatur
werden zunächst die thermodynamisch instabilsten Struk-

turen partiell thermisch denaturieren, zum Beispiel bei Nukleinsäuren durch Ausbildung von "Loop"-Regionen. Die Mobilität dieser Nukleinsäuren wird drastisch gesenkt, so daß diese in dem Trennmedium entweder "steckenbleiben" oder zumindest nur noch sehr langsam wandern. Die übrigen Komponenten wandern weiter durch das Trennmedium, bis jeweils ihre spezifische Denaturierung zum drastischen Mobilitätsverlust der jeweiligen Moleküle in dem Trennmedium führt. Bei bestimmter Wahl der Maschengröße des Trenngels führt die Restmobilität der quasi arretierten Biomoleküle dazu, daß nach einiger Zeit - wenn auch sehr langer Zeit - alle Komponenten des zu trennenden Gemisches die Trennstrecke durchwandern können. Unterstützt wird dieser Effekt dadurch, daß die Mobilität der partiell denaturierten Nukleinsäuren bei vollständiger Denaturierung - also Trennung in die Einzelstränge - wieder drastisch zunimmt, da jetzt nur noch die Einzelstränge durch das Trennmedium wandern. Die thermodynamisch instabilsten Nukleinsäuren, die bei tiefen Temperaturen bereits ihre Mobilität verlieren, wandern zwar sehr langsam im Gel weiter, erreichen jedoch irgendwann ein höheres Temperaturniveau, das zum vollständigen Aufschmelzen führt, so daß die Doppelstränge in ihre Einzelstränge zerfallen. Dies führt dann zu der oben beschriebenen beschleunigten Wanderungsgeschwindigkeit.

Dieser Effekt kann auch zur Beschleunigung der Elektrophorese insgesamt ausgenutzt werden. Sind die Komponenten durch Teildenaturierung und Mobilitätsverlust in dem Trennmedium voneinander getrennt worden, dann kann das Temperaturniveau des gesamten Trennmediums über den Schmelzpunkt der Doppelstränge hinaus erhöht werden, um alle Doppelstränge vollständig in Einzelstränge zu überführen. Danach gewinnen alle Komponenten ihre Mobilität zurück. Zur Durchführung dieser Verfahrensweise ist es jedoch erforderlich, daß die Temperatur entweder sehr

schnell über das gesamte Trennmedium äquibriert wird oder die Elektrophorese bis zur Äquibrierung der Temperatur unterbrochen wird, beispielsweise durch Abschaltung des elektrischen Feldes. Vorzugsweise sind die zu trennenden Moleküle von ähnlicher Größe. Die Verfahrensweise unter den beschriebenen Bedingungen gewährleistet dann bei der isothermischen Elektrophorese mit hohem Temperaturniveau, daß die getrennten Komponenten im weiteren Verlauf der Elektrophorese ihren relativen räumlichen Abstand beibehalten.

Eine andere Verfahrensweise benutzt lediglich ein zeitlich gesteuertes variables Temperaturprogramm vorzugsweise an der Probenauftragsseite der Elektrophorese zum Aufbau eines zeitlichen Temperaturgradienten, der zur Trennung der Komponenten des Stoffgemisches führt. Man läßt die zu trennende Probe zunächst elektrophoretisch in das Trennmedium hineinwandern. Das Temperaturniveau auf der Probenauftragsseite ist so gewählt, daß beispielsweise bei Nukleinsäuren die Doppelstränge zu "Loops" aufgeweitet sind, ohne jedoch vollständig aufgeschmolzen zu werden. Die Bildung von "Loops" kann durch geeignete Reagenzienwahl unterstützt werden. Dies führt dazu, daß die zu analysierenden Komponenten am Beginn der Elektrophorese in dem Trennmedium quasi arretiert sind. Wird nun die Temperatur abschnittsweise gesenkt, so bilden sich die thermodynamisch stabilsten Doppelstränge zurück, so daß diese Nukleinsäuren eine erhöhte Mobilität aufweisen. Diese beginnen dann durch das Trenngel zu wandern. Durch die nachfolgende Temperaturänderung werden dann nachfolgend die Nukleinsäuren mit der nächstniedrigeren thermodynamischen Stabilität mit der Wanderung beginnen. Es kann vorteilhaft sein, die Temperaturabsenkung schrittweise durchzuführen, um den Trennungseffekt in räumlicher Hinsicht zu verstärken. Die mit der Wanderung beginnenden Moleküle gewinnen quasi einen räum-

- lichen Vorsprung beim Durchwandern des Trennmediums. Bei hinreichend großem Abstand der thermodynamischen Stabilität ist es jedoch auch möglich, den Temperaturgradienten relativ schnell kontinuierlich zu senken. Bei dieser Verfahrensweise kann es vorteilhaft sein, auch den Elektrophorese-Endpunkt mit einer regelbaren Heiz- oder Kühlvorrichtung zu versehen.
- 10 Bei allen erfindungsgemäßen Verfahrensweisen ist es jedoch notwendig, zum Aufbau eines reproduzierbaren Temperaturgradienten bzw. reproduzierbarer isothermischer Bedingungen das Trennmedium mit einem thermisch leitenden Thermostatiertmantel zu umschließen. Zur Ausbildung des
- 15 reproduzierbaren Temperaturgradienten bzw. des isothermen Temperaturniveaus ist es unbedingt erforderlich, daß der Energiefluß im Thermostatiertmantel klein ist gegenüber den Energieflüssen in Heiz- und Kühlelement.
- 20 Die zur Temperatur-Gelelektrophorese verwendbaren Temperaturen liegen vorzugsweise im Bereich von 0 bis 100°C. Das Trennmedium besteht vorzugsweise aus Polyacrylamid-Gelen.
- 25 Das technische Problem der Detektion von Komponenten eines Stoffgemisches, bei dem das Gemisch aus Nukleinsäuren besteht, die insbesondere lediglich eine Mutation aufweisen, wird durch ein Verfahren gemäß Patentanspruch 12 gelöst. Die Unteransprüche 13 bis 25 sind bevorzugte
- 30 Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens. Das in den Patentansprüchen 26 bis 30 beanspruchte Oligonukleotid wird vorzugsweise als sogenannter Primer zum Start der polymerase chain reaction (PCR) verwendet (Saiki et al. (1985), Science 230, 1530-1534). Eine besondere Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird in den Patentansprüchen 32 bis 36 beschrieben. Die Patentansprüche 37 bis 43 betreffen die Verwendung des erfin-

dungsgemäßen Verfahrens. Die Ansprüche 44 bis 46 b treffen bevorzugte Mittel zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

5

Das erfindungsgemäße Detektionsverfahren für Mutationen in Nukleinsäuregemischen wird im folgenden näher erläutert.

10 Das für die Mutationsanalyse in Frage kommende Nukleinsäurefragment wird zunächst auf eine passende Größe geschnitten. Dabei wird die Mutation in einen thermodynamisch labilen Bereich gelegt. Dieser Bereich kann entweder experimentell oder auch durch Berechnung ermittelt
15 werden. Gegebenenfalls kann das Nukleinsäurefragment durch PCR (polymerase chain reaction) amplifiziert werden. Dabei wird vorzugsweise die thermodynamisch stabilere Region so stabilisiert, daß sie unter maximal denaturierenden Bedingungen des analytischen Experimentes
20 noch stabil bleibt. Das Nukleinsäurefragment schmilzt dann nicht bis zur vollständigen Strangtrennung auf, sondern bildet eine Y-förmige Struktur geringer elektrophoretischer Mobilität aus. Insbesondere kann diese Stabilisierung durch Anfügung einer Region aus stabilisierenden G/C-Nukleotiden oder ungeladenen Nukleotiden
25 herbeigeführt werden. Der stabilisierende Einfluß von mehr als 40 G/C-Basenpaaren wurde bereits von Sheffield, V.C. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 232-236, beschrieben. Überraschenderweise hat sich jedoch
30 gezeigt, daß bereits 20 bis 30 G/C-Basenpaare zur Stabilisierung ausreichend sind. Vorzugsweise bedient man sich der Temperaturgradienten-Gelelektrophorese, wie sie erfindungsgemäß beschrieben wird. Aber auch die Methode der DE-OS 36 22 591 kann Verwendung finden, wobei der Temperaturgradient in einer Plattenelektrophores Vorrichtung ausgebildet wird und die Trennung mit einem auf einer Platte angeordneten Gel durchgeführt wird.

Will man bestimmte Nukleinsäurefragmente durch Amplifizierungsreaktionen wie der sogenannten PCR (polymerase chain reaction) vervielfältigen, werden dazu Oligonukleotide als sogenannte Primer verwendet. Diese Primer werden so gewählt, daß sie in der Lage sind, mit einem Teil der zu untersuchenden Nukleinsäure zu hybridisieren. Vorteilhafterweise sollen die Sonden mit den endständigen Regionen dieser zu untersuchenden Nukleinsäuren hybridisieren. Des weiteren ist es wünschenswert, die Primer mit Restriktionsschnittstellen zu versehen, um die amplifizierten Segmente in Vektoren einbauen zu können. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform weisen die Primer endständig chemische Gruppen auf, die als Affinitätsliganden dienen können.

In Figur 1 ist ein besonders bevorzugtes Oligonukleotid schematisch dargestellt, welches als Primer in einer PCR Verwendung finden kann. Der Primer Hnpl besteht aus einer hybridisierenden Sequenz 1, welche etwa 18 bis 25 Nukleotide aufweist. Zum freien Ende schließt sich eine G/C-Box aus vorzugsweise 20 bis 30 Nukleotiden an, gefolgt von einer Restriktionsschnittstelle sowie einer oder mehreren chemischen Gruppen, die als Affinitätsliganden dienen können. Der Primer p2 besteht ebenfalls aus einer hybridisierenden Sequenz 2, einer A/T-reichen Box mit 0 bis 20 Nukleotiden Länge und einer Restriktionsschnittstelle R2. Im Falle der Mutantenanalyse innerhalb hochpolymorpher Regionen ist es empfehlenswert, die Größe der Regionen C, D (Fig. 10) so klein wie möglich, im Extremfall auf 0 Nukleotide zu halten, um nur eine polymorphe Position zu erfassen. Dies sei an einem Beispiel der Sondenkonstruktion zum Nachweis der β -Globin Thalassämie "Yugo" (IVS-1-6, T-C) exemplarisch ausgeführt.

Ein wichtiger Typ einer β -Globin Thalassämie ist die Splicing-Mutante (IVS-1-6, T-C) auf dem β -Globin Locus.

5 Diese Mutation verhindert das korrekte Splicing zwischen Exon 1 und Exon 2. Die Umgebung des mutierten Genortes IVS-1-6 ist in Figur 2 wiedergegeben. Es wird ein Ausschnitt des humanen β gb-Locus 62200 bis 62350 (GenBank-Sequenz HUM HBB_PREMRNA) mit intron-Mutante IVS-1-6 und den erfindungsgemäß verwendeten Primern gezeigt.

10 Figur 3 zeigt das berechnete Schmelzverhalten dieser Nukleinsäure, erhalten unter Anwendung des von Gerhard Steger et al. entwickelten Rechenschemas (Steger, G., Po, T., Kaper, J. u. Riesner, D. (1987), Nucleic Acids Res. 15, 5085-5103). Das in Figur 2 wiedergegebene Segment schließt die intron 1- β^+ -Mutation IVS-1-6 ein. Die Numerierung korrespondiert mit der GenBank Sequenz HUM HBB_PREMRNA. Die optimale Sonde für denaturierende Gele basiert auf dem amplifzierten Segment 62233-62340. Der Primer 1a* ist mit einem sogenannten G/C-Schwanz konstruiert. BamH1- und EcoR1-Restriktionsschnittstellen wurden zur Integration in den Vektor pBR322 gewählt. Die Berechnungen für die verschiedenen DNA-Denaturierungszustände von β -Globin-Segmenten bei verschiedenen Temperaturen für 1 M NaCl sind graphisch dargestellt. Das in Figur 3 dargestellte Schmelzdiagramm ist wie folgt zu verstehen: Auf der Abszisse ist die Position der Nukleinsäuren angegeben, während die Ordinate die Wahrscheinlichkeit der Strangöffnung repräsentiert, bezogen auf die spezifische Nukleotidposition. Die dritte Achse des dreidimensionalen Diagramms entspricht einer Temperaturachse, wobei zu beachten ist, daß die Schmelztemperaturen ebenfalls abhängig sind von der Ionenstärke des Mediums. Die Wahrscheinlichkeit für den geöffneten Zustand eines Basenpaares ist in Schritten von 0,5°C berechnet. Die dreidimensionale Zeichnung illustriert das sequentielle Denaturierungsverhalten verschiedener kooperativ denaturierender Regionen. Wie in Figur 4 dargestellt, erniedrigt ein interner Loop von der Größe eines Basenpaares

bei Position 62302 die Schmelztemperatur der Region mit der geringsten Stabilität.

5

Die Figur 5 betrifft die Berechnung der temperaturabhängigen Schmelzkurve in integrierter Form (5a) und in der differentiellen Form (5b), wobei das Symbol (*) den Kurvenverlauf des Wildtyp-Homoduplex und (+) den Kurvenverlauf des Heteroduplex (Mv) als A/C-Fehlpaarung bedeuten.

10

Die Figur 5a zeigt die theoretisch abgeleitete optische Schmelzkurve des Nukleinsäuredoppelstrangs sowohl des Homo- als auch des Heteroduplexes (A/C). Figur 5b zeigt die erste Ableitung der in Figur 5a berechneten Schmelzkurve. Es ist erkennbar, daß der Heteroduplex (+++) im Bereich der thermodynamisch labilen Region infolge der Mutation deutlich stärker destabilisiert ist als der Homoduplex (***) aufgrund des in sogenannten Mismatches hervorgehobenen internen Loops. In diesem Fall beträgt die Schmelzpunktniedrigung dieser thermodynamisch instabilen Region etwa 4°C gegenüber dem Homoduplex.

15

20

Die Figur 6 zeigt die Analyse des amplifizierten Mutanten-Segments mit Primer 1a*, Primer 1b gemäß Figur 2 und des amplifizierten Wildtyp-Segments auf der senkrechten Temperaturgradienten-Gelelektrophorese mit einem linearen Gradienten von 10 bis 60°C. Die äquimolar gemischten Fragmente wurden nach Denaturierung/Renaturierung aufgetragen. Die Heteroduplices (Mv, Vm) und die Homoduplices (Vv, Mm) werden aufgespalten gemäß der schematischen Darstellung. Eine homozygote DNA-Sonde vom Wildtyp wurde PCR-amplifiziert unter Einsatz der Primer 1a* wie oben beschrieben. Das Fragment wurde zwischen die BamH1-/EcoR1-Stelle von pBR322 integriert. Eine DNA-Probe der homozygoten Mutante IVS-1-6 wurde amplifiziert mit BamH1 und Ec R1 geschnitten, denaturiert und hybridisiert mit einem

30

5 klonierten BamH1-/EcoR1-Fragment der Wildtyp gb-Sequenz. Die resultierenden Homoduplices (2 Banden) und Hetero-
duplices (2 Banden) sind als vier unterschiedliche Banden
repräsentiert. Die Y-förmigen Konformationen wurden sta-
bilisiert durch den Einsatz der G/C-reichen Oligonukleo-
tid-Kette am stabilsten Ende der zu untersuchenden Nukle-
insäure (s. Myers, R.M. et al. (1985), Nucleic Acids
10 Res. 13, 3131). Bei Anwendung der parallelen Temperatur-
gradienten-Gelelektrophorese ergibt sich bei Mutation
IVS-1-6 im Probenmaterial das in Figur 7 dargestellte
Bild.

15 Die Figur 7 zeigt die Autoradiographie einer Analyse
verschiedener Patienten-DNAs nach Amplifikation und Test
mit dem Wild-Typ Standard (s. Fig. 6, Fig. 2). Die
Patienten-DNAs, die die IVS-1-6-Mutation enthalten,
weisen eine zweite Bande auf. Da die Test-DNA nur einen
20 markierten Strang enthält, enthalten nur zwei der vier
Banden die radioaktive Markierung (s. Einschub in Fig.
7). Der parallele Temperaturgradient verläuft zwischen
25 und 65°C.

25 Das Experiment zeigt darüberhinaus, daß das Mutantennach-
weissystem nicht nur zum qualitativen sondern auch zum
quantitativen Nachweis geeignet ist. Das im molaren Unter-
schuß zugesetzte (radioaktiv) markierte Markerfragment
(Wildtyp) verteilt sich nach Denaturierung/Renaturierung
30 anteilig auf die beiden Allele. Die Mutation des einen
Allels hat keinen Einfluß auf die 1:1 Verteilung des
Markers (Fig. 7). Der Marker selbst trägt nur unterhalb
der experimentellen Fehlergrenze ($\pm 10\%$) zur Verschie-
bung des 1:1 Verhältnisses bei. Wenn der interne
Standard wie im Fall der gleichverteilten Allele nicht
im zu amplifizierenden Gemisch vorhanden ist, kann er
extern zugesetzt werden. Ein interner Standard definier-
t r Kopienzahl kann dazu dienen, ein Template quantitativ

5 zu erfassen, wenn es sich in einer Mutation vom Standard unterscheidet. Da exakt identische Primer eingesetzt werden, wirken sich Plateau-Effekte, ungleiche Primerkonzentrationen oder schlechte Replikationseffizienz immer streng symmetrisch auf beide Komponenten aus. Wenn sich Standard und zu messende Zielsequenz nicht um mehr als Faktor 100, vorzugsweise 10 unterscheiden, läßt sich 10 die Kopienzahl über das Signalverhältnis korrekt ermitteln (Fig. 9). Experimentell bedeutet dieser Ansatz eine starke Vereinfachung, da die Polymerase Chain Reaction (PCR) unkontrolliert bis in die Sättigung getrieben werden kann.

15 Die Figur 9 verdeutlicht schematisch das Verfahren, das in Figur 7 beschrieben wird. Es wird der zu amplifizierenden DNA ein Standard bekannter Konzentrationen (Kopienzahl) zugesetzt, wobei sich der Standard in mindestens einer Mutation, z.B. einer Punktmutation, von der zu analysierenden Nukleinsäure unterscheidet. Diese Mischung wird einem enzymatischen Amplifizierungsverfahren bis zur Sättigung unterworfen. Danach wird dem Amplifikationsgemisch im Unterschuß der Standard in markierter Form zugesetzt. Nach mindestens einem Denaturierungs/Renaturierungszyklus wird die Markierung im zahlenmäßigen Verhältnis vom internen Standard und zu 20 quantifizierender Zielsequenz in die entsprechenden Homo- und Heteroduplexe überführt. Die Trennung der Homo- und 25 Heteroduplexe erfolgt mittels TGGE. Das Verhältnis der Signalintensität der entstandenen Banden ergibt nach Multiplikation mit der Standardkopienzahl die Menge der 30 zu bestimmenden Zielsequenz.

Eine besonders einfache und effektive Probenvorbereitung für die Analyse der zu untersuchenden Nukleinsäure wird durch die Verwendung eines Primers mit Affinitätsgruppen ermöglicht. Als Affinitätsgruppen können beispielsweise

5 Histidyl- und Biotinylreste in Frage. Im Fall der Histidylreste kommen zwei bis acht, besonders bevorzugt sechs Histidylreste zum Einsatz. Dieser chemisch modifizierte Primer wird dann an einen polymeren Träger über entsprechende Affinitätsgruppen fixiert. Im Fall der histidylmodifizierten Primer empfiehlt sich ein an einen polymeren Träger gebundener Chelatkomplex aus zweiwertigen Übergangsmetallionen, wie Kupfer und Nickel, und Nitrilotriessigsäure. Die freien Koordinationsstellen des Übergangsmetallions werden durch zwei Histidylreste besetzt. Da Primer und Histidylreste kovalent miteinander verbunden sind, wird auf diese Weise der Primer an die polymere Matrix gebunden. Komplexe sind für rekombinante Proteine (EP-A-0 282 042, EP-A-0 186 069) an NTA-Harze beschrieben worden (EP-A-0 253 303). Werden beispielsweise Biotinylreste kovalent an den Primer gebunden, empfiehlt sich ein polymerer Träger, der Avidinmoleküle kovalent gebunden hat.

25 Als polymere Träger kommen entsprechend modifizierte Membranen oder entsprechend modifizierte Partikel in Frage. Der polymere Träger soll mechanisch hinreichend stabil sein, um bei Operationen auftretende Druckschwankungen aufgrund von Durchfluß unbeschadet zu überstehen. Werden nun Nukleinsäuren mit Mutationen unter Verwendung des beschriebenen Primers amplifiziert, so bilden sich Doppelstränge aus, welche an einem Ende (Primer-vermittelt) besagte Affinitätsgruppen tragen. Nach erfolgter hinreichender Amplifizierung bringt man das Reaktionsgemisch mit dem polymeren Träger und daran gebundenen Affinitätsgruppierungen wie Nickelchelaten oder Avidinmolekülen zur Umsetzung. So werden spezifisch die durch den Primer amplifizierten Sequenzen an der Oberfläche des festen Trägers gebunden. Dies kann entweder in einem Batch-Verfahren oder in Form einer Säulenfiltration erfolgen. Durch diese Vorgehensweise werden die unerwünschten

5 ten Enzyme und Reagenzien, welche zur Amplifikation
benötigt werden, einfach und schonend abgetrennt. Die an
der Matrix gebundenen amplifizierten Nukleinsäurefrag-
mente können nun in einfacher Weise mit einer markierten
Nukleinsäuresonde, die vom Wildtyp abgeleitet ist, inkubi-
10 ert werden. Durch einen oder mehrere Denaturierungs-/
Renaturierungszyklen bilden sich Heteroduplexe, die nach
Elution vom polymeren Träger, etwa durch Variation der
Pufferbedingungen oder Auswaschen mit einem Kompetitor,
der Analyse direkt unterzogen werden können. Die so auf-
gearbeiteten Proben können zum Beispiel unmittelbar der
15 Temperatur-Gelelektrophorese unterzogen werden.

Die Figur 8 stellt ein erfindungsgemäßes Schema zur TGGE-
gerechten Probenvorbereitung dar. Der Primer Hnpl trägt
einen Oligo-Histidyl-Rest als 5'-gekoppelte Seitenkette
und ist somit unter neutralen oder alkalischen Be-
20 dingungen an NTA-Liganden tragende Festphasenträger zu
binden. Bei diesem Schritt werden kontaminierende Enzyme
und Reagenzien entfernt. Nach Zugabe des Nachweisrea-
genzes und eventuell interner Markersubstanzen wird der
Denaturierungs-/Renaturierungszyklus durchlaufen. Auf
25 diese Weise werden die umrahmten Strukturen Mm und Mv
(markierter Homoduplex/markierter Heteroduplex) zur TGGE-
Analyse verfügbar. Das heißt, der zweite Strang des Ana-
lyten wird in der nachfolgenden TGGE-Analyse nachgewie-
sen.

30

Die erfindungsgemäße Vorrichtung, die in den Ansprüchen
51 bis 62 beansprucht wird, erlaubt insbesondere die
Durchführung der erfindungsgemäßen Verfahren. Die Vor-
richtung besteht aus mindestens zwei Heiz- oder Kühl-
vorrichtungen oder einer Heiz- und einer Kühlvorrichtung
zum Aufbau des Temperaturgradienten. Die Heiz- oder
Kühlvorrichtungen sind mit Wärmereservoirs verbunden, um
die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren geforderten

Energieflüsse zu gewährleisten. Die Wärmereservoirs und Heiz- oder Kühlvorrichtungen sind so ausgebildet, daß sie einen ein Trennmedium enthaltenden Hohlkörper vollkommen umgeben. Dieser Hohlkörper enthält die zur Trennung verwendete Trennmatrix oder das trägerfreie Trennmedium in seinem Lumen. Zum Aufbau des reproduzierbaren Temperaturgradienten oder bei isothermer Verfahrensweise zur Gewährleistung eines reproduzierbaren einheitlichen Temperaturniveaus des Trennmediums ist der Hohlkörper von einem Thermostatiermantel umgeben. Dabei kann der Thermostatiermantel vorzugsweise thermisch leitend mit dem Wärmereservoir oder den Heiz- oder Kühlvorrichtungen verbunden sein.

In einer bevorzugten Ausführungsform kann der Thermostatiermantel durch eine Metallplatte gebildet werden, die mit Bohrungen versehen ist, in die der das Trennmedium enthaltende Hohlkörper, vorzugsweise Glas- oder Kunststoffröhrchen, eingeführt werden können. Vorzugsweise werden zwei Metallplatten mit eingefrästen parallelverlaufenden Nuten verwendet, wobei die durch die Nuten entstehenden Aussparungen nach dem Zusammenlegen der Metallplatten der äußeren Form des zur Trennung verwendeten Hohlkörpers entsprechen und die Metallplatten in unmittelbarem Wärmekontakt stehen.

Die Figur 10 zeigt schematisch den Aufbau einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung. Figur 1a zeigt einen Querschnitt durch den von einem Thermostatiermantel umschlossenen Hohlkörper mit innen angeordnetem Trennmedium längs der Linie A --- A.

Die Figur 11 zeigt eine weitere bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung zum Aufbau eines zeitlichen Temperaturgradienten.

Die Figur 12 zeigt schematisch eine Ausführungsform der
erfindungsgemäßen Vorrichtung, die eine Vielzahl der zur
Trennung verwendeten Hohlkörper aufnehmen kann.

Die Figur 13 verdeutlicht schematisch den erfindungs-
gemäßen Verfahrensablauf mit einer Vorrichtung gemäß
Figur 11.

Die Figur 14 und 14a zeigt eine bevorzugte Ausführungs-
form der erfindungsgemäßen Vorrichtung gemäß Fig. 12.
Hierbei ist der Thermostatiermantel aus einer aus zwei
Teilen bestehenden Metallplatte gebildet. Der röhrenför-
mige, das Trennmedium enthaltende Hohlkörper wird in auf
beiden Platten parallelverlaufenden Nuten gehalten.

Die Figuren 14a, 15a und b zeigen einen seitlichen Quer-
schnitt durch die Vorrichtung gemäß Figur 14 längs der
Linie B --- B, wobei Figur 15a als Momentaufnahme in
schematischer Form die Probenaufnahme demonstriert. Die
Figur 15b zeigt die Vorrichtung in betriebsbereitem Zu-
stand, indem der zur Trennung verwendete Hohlkörper je-
weils oben und unten in ein Pufferreservoir 50 eintaucht.

Die in Figur 10 dargestellte bevorzugte Ausführungsform
besteht aus zwei Heiz- oder Kühlvorrichtungen 1, 2 mit
den dazugehörigen Temperaturen T_2 und T_1 . Diese Heiz-
bzw. Kühlvorrichtungen 1, 2 sind leitend mit Wärmere-
servoirs 4, 5 verbunden. Die Heiz- oder Kühlvorrichtun-
gen sowie das Wärmereservoir weisen vorzugsweise zen-
trische Durchbohrungen auf. Durch diese Bohrungen ist
ein Hohlkörper 6 vorzugsweise beidseitig durchdringend
angeordnet. Der Hohlkörper 6 ist von einem Thermosta-
tiermantel 7 allseitig umschlossen. Vorzugsweise befin-
det sich der Hohlkörper 6 im Thermostatiermantel 7 zen-
triert. Der Hohlkörper 6 enthält in seinem Lumen das zur
Trennung verwendete Medium. Der Thermostatiermantel 7

besteht vorzugsweise aus wärmeleitendem Material, besonders bevorzugt einem Material, aus dem auch die
5 Wärmereservoirs hergestellt sind. Die Temperaturniveaus 1, 2 werden vorzugsweise durch Peltierelemente, thermostatisierbare Flüssigkeitsbäder oder elektrische Heizungen 9 beheizt bzw. gekühlt. Am Ende der Trennstrecke ist eine Detektionseinheit 10 vorgesehen. Die Fig. 10a zeigt
10 die Situation im Querschnitt längs der Linie A --- A. Der Zwischenraum zwischen der äußeren Wand des Hohlkörpers 6 und der inneren Wand des Thermostatiermantels 7 ist vorzugsweise durch eine viskose Flüssigkeit 8 ausgefüllt. Das Trennmedium füllt vollständig den Querschnitt
15 des Hohlkörpers 6. Der Hohlkörper 6 ist vorzugsweise zylindrisch ausgebildet, besonders bevorzugt als Kapillare. Die an einer beliebigen Stelle der Trennstrecke herrschende Temperatur berechnet sich nach der Formel $T = T_2 - (T_2 - T_1) \times d_2 / (d_1 + d_2)$. Dabei bedeutet d_1 der
20 Abstand des Ortes von der Temperatur T_1 und d_2 der Abstand des Ortes von der Temperatur T_2 , die jeweils an den Temperaturniveaus 2, 1 herrschen.

Die Fig. 11 zeigt eine bevorzugte Ausführungsform zur
25 Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens als einer von einem zeitlichen Temperaturgradienten überlagerten Elektrophorese. Sie besteht aus drei Temperaturniveaus 1, 2, 3, die vorzugsweise wiederum mit Wärmereservoirs verbunden sind. Die Komponenten Hohlkörper 6, Wärmeaus-
30 tauschmantel 7, Detektionseinheit 10, Heiz- oder Kühlvorrichtung 9 sind ähnlich der Vorrichtung gemäß Fig. 10 ausgebildet. Lediglich der Thermostatiermantel 7 ist mit dem Wärmereservoir der Heiz- oder Kühlvorrichtung am Temperaturniveau 2 thermisch nicht leitend verbunden.

Die Figuren 13a bis 13d zeigen den Verfahrensablauf wie er beispielsweise mit einer V rrichtung gemäß der Fig. 11 ausgeführt wird. Der Gradient des elektrischen Feldes,

das zur Trennung verwendet wird, ist in Richtung der Abszisse aufgetragen und symbolisiert gleichzeitig beliebige Orte der zu durchlaufenden Trennstrecke. Auf der Ordinate sind einmal in positiver Richtung die Temperaturniveaus in Abhängigkeit vom Ort eingezeichnet (Fig. 13a). Die Wanderungsgeschwindigkeit der Komponenten der zu trennenden Probe ist durch Stufenfunktion unterhalb der Temperaturkurve dargestellt. Z.B. ist die Wanderungsgeschwindigkeit (V) bei T_1 (t_0) ungefähr gleich Null. Aufgetragen wird die Probe bei Temperaturniveau T_0 , das in diesem Fall einfachheitshalber gleich dem Temperaturniveau T_2 am Ende der Elektrophorese-Trennstrecke sein soll. Nach Auftrag nehmen die Stoffe 1 und 2 das gepunktete Volumen in bezeichneter Position ein. Die Probe wandert längs des Feldgradienten in dem Trennmedium, bis sie das Temperaturniveau T_1 erreicht. Wenn beispielsweise die Probe aus Nukleinsäuren besteht, erfahren diese hier eine teilweise Denaturierung durch Aufweitung des Doppelstrangs in sogenannte "Loops". Dadurch bedingt wird die Wanderungsgeschwindigkeit reduziert. Die Probe wird aufkonzentriert an der Grenze zwischen T_0 und T_1 . Diese Situation ist in Fig. 13b in Form des geringeren Volumens dargestellt (Zeitpunkt t_1). Die Temperatur des Temperaturniveaus T_1 wird nun abgesenkt als Funktion der Zeit. Die thermodynamisch stabilere Fraktion, in Fig. 13c als Fraktion Nr. 2 gekennzeichnet, schließt nun die Doppelhelix und gewinnt höhere Mobilität. Dadurch bedingt beginnt diese Fraktion in das Trennmedium zu wandern. Fig. 13d zeigt nun die Situation bei einem Zeitpunkt t_3 , bei dem die Temperatur T so weit abgesunken ist, daß auch die thermodynamisch instabilere Probe, hier mit der Nr. 1 gekennzeichnet, mit der Wanderung durch das Trennmedium beginnt. Die Komponente Nr. 2 hat in dieser Zeit allerdings schon einen beträchtlichen Teil der Trennstrecke durchlaufen der sie bei entsprechender Dimensionierung bereits verlassen, wo sie detektiert werden kann.

5 Diese Ausführungsform verwendet vorzugsweise eine sehr kurze Kapillare mit Trennmedium und läßt sich an drei thermisch voneinander getrennten Bereichen thermosta-
10 tieren (T_0 , T_1 , T_2). Die an der Temperaturgrenze zwischen T_0 und T_1 stattfindende partielle Denaturierung, beispielsweise von Nukleinsäuren zur Bildung interner "Loops", kann durch entsprechende Reagenzien unterstützt werden.

15 An den Grenzen der einzelnen Temperaturniveaus kommt es jedoch über einen flüssigen Wärmetauscher zu unscharfen Temperaturgrenzen, so daß die Darstellung gemäß Fig. 12 nur als idealisierte Rechteckform von Temperatur und Wanderungsgeschwindigkeit gesehen werden soll. Um trotz-
20 dem eine möglichst scharfe Grenze der Temperaturniveaus zu gewährleisten, wird bevorzugt, die Temperaturniveaus $T_2/T_1/T_0$ nicht wärmeleitend zu verbinden.

25 Diese erfindungsgemäße Verfahrensweise ist auch mit flächigen Trennmedien realisierbar, die einseitig temperiert werden, wie es für einfache räumliche Temperaturgradienten in der deutschen Patentanmeldung P 36 22 591 beschrieben ist.

30 Die Fig. 12 zeigt eine bevorzugte Vorrichtung, die dadurch gekennzeichnet ist, daß Heiz- und Kühlvorrichtungen 1, 2 mit den entsprechenden Wärmereservoirs 4, 5 eine Vielzahl der Hohlkörper 6 aufnehmen können, indem die Vorrichtungen 1, 2 und 4, 5 blockartig - 4a, 5a - ausgestaltet sind und eine Vielzahl von Durchbohrungen 11 aufweisen, durch die die Hohlkörper 6 hinausragend, vorzugsweise endseitig hinausragend angeordnet sind. Diese Vorrichtung hat den Vorteil, daß sich mit einer Vorrichtung eine Großzahl von Analysen mit dem Ziel der Detektion von bekannt n der unbekannten Mutati nen durchführen läßt. Die V rrichtung gewährleistet, daß mehrere

5 Proben gleichzeitig unter Temperierung durch verschiedene
Thermostatierelemente, jedoch mit je einem gemeinsamen
Heiz- oder Kühlsystem analysiert werden können. Eine
bevorzugte Ausführungsform ist auf das Format Mikrotiter
(96 Well) adaptiert im Sinne linearer Mehrkanalsysteme,
vorzugsweise 8 oder 12, oder einem 96-Kanal-System. Als
10 "Read out"-System finden vorzugsweise fluoreszenzmarkier-
te Nukleinsäuresonden Verwendung, die optisch durch
handelsübliche Detektionssysteme am Anfang und/oder am
Ende der Thermostatiervorrichtung als Funktion der Trenn-
dauer und ortsfest registriert werden können. Damit
15 lassen sich mit Hilfe von geeigneten Reagenzienkits Muta-
tionen in genetischem Material automatisch auswerten.

Die thermische Äquilibration der jeweiligen Heiz- oder
Kühlvorrichtungen kann homogen elektrisch über Heiz-
drähte, vorzugsweise jedoch über Peltierelemente erfol-
20 gen. Auch flüssige Heizvorrichtungen in Form thermosta-
tischer Flüssigkeitsbäder kommen in Frage. Hierbei ist
jedoch darauf zu achten, daß die mit den thermostatier-
baren Ummantelungen der Kapillare verbundenen Heiz- oder
Kühlvorrichtungen gegenüber allen Ummantelungen nahezu
25 identische Temperaturen an den jeweiligen Übergangs-
stellen aufweisen. Dieses läßt sich durch eine symme-
trisch gebaute Peltierheizung/-Kühlung realisieren oder
im Falle der Flüssigtemperierung durch gegenläufige durch-
strömte Kanäle, wobei die Summe der Temperaturen gegen-
30 überliegender Flüsse an jeder Kapillarposition nahezu
identisch bleibt.

Die erfindungsgemäß ausgestaltete Temperaturgradienten-
Gelelektrophorese eignet sich insbesondere auch für eine
Vorgehensweise, bei der ein Temperaturgradient nicht
räumlich dimensioniert ist, sondern zeitlich variabel
bzw. zeitlich gradientenförmig aufgebaut wird. Darunter
ist zu verstehen, daß ein Heiz- oder Kühlreservoir mit

5 einem zeitlich definierten Temperaturprogramm geregelt wird, wodurch sich die Mobilitäten der zu trennenden Moleküle letztlich als Funktion der Zeit steuern lassen. So läßt sich zum Beispiel eine offene zirkuläre Nukleinsäure oder auch eine partiell denaturierte doppelsträngige Nukleinsäure bei hohen Temperaturen im Gel quasi "arretieren" und erst nach Ablauf einer bestimmten Zeit durch Senken der Temperatur nach reversibler Strukturrückbildung in dem Trennmedium mobilisieren. Dies gilt für die Trennung in Kapillaren und auf flächigen Trägern. Der Vorteil dieser Technik liegt darin, daß hierbei äußerst kurze Trennstrecken realisiert werden können.

15 Die schematischen Figuren 15a und b zeigen eine bevorzugte Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens, in welches gemäß Figur 14 12 Proben simultan analysiert werden können. Es ist erkennbar, daß insgesamt 4 Temperaturniveaus T_0 bis T_3 variabel geregelt werden können. Mit dieser bevorzugten Vorrichtung lassen sich sowohl räumliche, zeitliche als auch Kombinationen aus räumlichen und zeitlichen Gradienten aufbauen. Diese erfindungsgemäße Vorrichtung ist besonders geeignet, im Laboratorium die Parameter zur Trennung der zu analysierenden Proben zu optimieren.

30 Die Figur 14 zeigt eine bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung. Es sind insgesamt 4 regelbare Heiz- bzw. Kühlvorrichtungen (35 bis 38) vorhanden. Die Temperaturniveaus T_0 bis T_3 sind unabhängig voneinander regelbar. Die Temperatur wird durch Einleiten entsprechend temperierter Flüssigkeiten, durch die Zuläufe 40, in die hier als Metallblöcke ausgestalteten Temperaturreservoirs eingestellt. Auf der gegenüberliegenden Seite der Zuflüsse 40 werden die zur Temperierung verwendeten Flüssigkeiten durch entsprechende Abläufe (hier nicht gezeichnet) abgeleitet. Der das Temperaturniveau

35 bildende Metallblock ist mit Durchbohrungen versehen, in welchen die zur Trennung verwendeten Hohlkörper 6 durchgeschoben werden können. Die den Thermostatiermantel bildende Metallplatte 7 ist aus zwei Teilen, die vorzugsweise verschraubt sind, aufgebaut. In dieser Platte befinden sich an jeweils gegenüberliegenden Positionen eingefräste Nuten, die auf den Durchmesser des Hohlkörpers 6 abgestimmt sind. Die Metallblöcke 35 bis 38, welche die entsprechenden Temperaturniveaus bereitstellen, sind mittels eines Verbindungsstücks 43 durch Schrauben mit dem Thermostatiermantel 7 verbunden.

Die Figur 14a zeigt einen Querschnitt der in Figur 14 gezeichneten Vorrichtung längs der Linie B --- B. Der zur Trennung dienende Hohlkörper 6 durchdringt die den Thermostatiermantel bildenden Hohlkörper 7 vollständig. Vorzugsweise befindet sich im Zwischenraum, der zwischen Hohlkörper 6 und Thermostatiermantel 7 gebildet wird, eine viskose Flüssigkeit. Die Metallblöcke 37 und 38 sind thermisch leitend durch direkten Kontakt der planaren Seitenflächen mit dem Thermostatiermantel 7 verbunden. Vorzugsweise sind die Blöcke 37, 38 und der Thermostatiermantel 7 aus dem selben Material gefertigt. In einer besonderen Ausführungsform sind diese Elemente der erfindungsgemäßen Vorrichtung einstückig. Die das Temperaturniveau T_0 , T_1 aufbauenden Metallblöcke sind beispielsweise einstückig mit dem den Hohlkörper 6 umfassenden Thermostatiermantel. Die die Temperaturniveaus T_0 , T_1 aufbauenden Metallblöcke 35, 36 sind durchbohrt. Die Bohrungen in den verschiedenen Metallblöcken und dem Thermostatiermantel werden zur Deckung gebracht, so daß der zur Trennung verwendete Hohlkörper 6 durch die aus den einzelnen Elementen 35, 36, 37 und 38 aufgebaute Vorrichtung hindurchgeschoben werden kann. Die Metallblöcke 35 bis 38 sind mit den Durchbohrungen 15 (Querschnitt) versehen, durch welche die zum Aufbau

- 28 -

des jeweiligen Temperaturniveaus verwendete Flüssigkeit hindurchströmt.

5

Im folgenden wird beschrieben, wie das in der Figurenbeschreibung zu Figur 2 und 3 beschriebene Gemisch aus markierten Hybriden, die einen Homoduplex und einen Heteroduplex (Einbasen-mismatch) repräsentieren, getrennt wird. Die zwei in der Figurenbeschreibung zu Figur 2 und 3 beschriebenen klonierten Inserts (Wildtyp und IVS-1-6) wurden in Form ihrer EcoRI/Bam HI verdauten Plasmide (je 45 ng) gemischt. Ihnen wurde in limitierter Menge (9 ng bezogen auf Plasmid) das radioaktiv markierte Insert beigemischt, wobei der Radioaktivitätsmarker durch ^{32}P -dATP, dCTP, dGTP, dTTP-Einbau mit Polymerase-1 Klenow-Fragment erfolgt. Die spezifische Aktivität betrug ca. 10^6 cpm/pMol Schnittstelle. Die Mischung wurde in 55 μl Puffer 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 7,5 bei 98°C für 2 Minuten denaturiert und nach Einstellen auf 250 mM NaCl bei 50°C für eine Stunde renaturiert. Die DNA wurde mit 2,5 Vol. Ethanol 30 Minuten bei -20°C gefällt, mit 80 % Ethanol gewaschen und getrocknet. Die Probe wurde in 0,01 x TBE Bromphenolblau aufgenommen. 13.000 cpm in 3 μl wurden auf einer planen Platinelektrode (Fig. 15a 30) als Tropfen 40 vorgelegt. Der Probenauftrag erfolgte elektrophoretisch nach Eintauchen der Kathoden-seitigen Kapillare durch Anlegung einer Spannung von 100 V gegen die geerdete Platinkathode 30 (Fig. 15a) für je 2 Minuten. Da der TBE-Puffer (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA, pH 8,3) in Richtung hoher pH-Werte eine hohe Pufferkapazität aufweist, wird die Probe trotz niedriger Pufferkonzentration (0,01 x TBE) nicht um mehr als eine pH-Einheit alkalischer (pH 8,3 bis 9,3). Ca. 50 % der markierten Nukleinsäure wird auf diese Weise vom Gel aufgenommen.

10

15

20

25

30

Als Kapillaren wurden gefüllte Glaskapillaren mit 5 %
 Polyacrylamid-Gel und einem Innendurchmesser von 0,45 mm
 verwendet. Die Pufferbedingungen waren mit 0,1 x TBE, 4
 M Harnstoff gewählt. Die Figur 15b zeigt schematisch die
 erfindungsgemäße Vorrichtung beim Elektrophoresebetrieb.
 nach erfolgter Probenaufnahme werden beide Enden der
 Kapillaren 6 in Kontakt mit je 100 ml Pufferreservoir 50
 gebracht.

a) Die Probe wurde in einem räumlichen Gradienten aufgetrennt ($T_3 = 30^\circ\text{C}$, $T_2 = 70^\circ\text{C}$).

Tabelle 1 zeigt die Differenz der Wanderungsstrecken des Homoduplexes verglichen mit der jeweiligen Wanderungsstrecke des Heteroduplexes in cm. Im erwarteten Temperaturintervall 40°C bis 50°C ergibt sich die experimentell gewünschte Auftrennung der Signale.

20	Elektrophorese- dauer (min.)	Differenz der Kapillargel-Position (mm) von Wildtyp Fragment und IVS-1-6-Fragment
<hr/>		
25	30	0
	42	0
	54	0
	66	0
	78	2
30	90	4
	102	6
	114	6
	126	7
	138	7
	150	9
	162	11

Die Daten beruhen auf Einzelmessungen in getrennten Kapillaren.

- 30 -

5 b) Analog der Vorgehensweise der Figuren 13a bis d wurde die Probe auf der Seite T_0 aufgetragen. ($T = T_2 = 37 = T_3 = 30^\circ\text{C}$) und die Trennung über die 4 mm Trennstrecke mit der Temperatur T_1 durchgeführt. Nur die Proben, die T_1 im Temperaturintervall ($40 < T_1 < 50$) passiert haben, werden aufgetrennt.

10 Während der Elektrophorese wurde erfindungsgemäß das Temperaturniveau von T_1 linear abgesenkt. Die Proben, die T_1 knapp unterhalb der Temperatur erreichen, bei der die Dissoziation in die Einzelstränge erfolgt (50°C),
15 werden im Segment T_1 36 (4 mm Trennstrecke) in Banden in einem relativen Abstand von bis zu 1 cm getrennt.

20 Die Kombination räumlicher und zeitlicher Gradienten der Temperatur, wie sie mit einem statisch chemischen Gradientensystem nicht erreicht werden kann, ist für einige Anwendungen von großer praktischer Bedeutung. Zwei Anwendungen seien exemplarisch dargestellt. Sie werden in Figur 16 schematisch erläutert.

25 a) Fragmente sehr unterschiedlicher nativer Wanderungsgeschwindigkeit, z.B. infolge stark differierender Größen der Fragmente, sind gemeinsam nur schwierig zu analysieren. Mitunter unterliegt das schnellwandernde kleine Fragment 60 (Fragmente und ihre jeweiligen Gelpositionen sind als kleine Balken repräsentiert)
30 bereits der Strangtrennung, während das große Fragment 70 die Temperatur beginnender Denaturierung noch nicht erreicht hat. Erfindungsgemäß wird die hohe Temperatur T_2 so eingestellt, daß noch keine Trennung des stabilsten Doppelhelix-Segments bzw. der G:C Klammer eintritt. Die Temperatur T_1 wird jedoch während der Elektrophorese von niedriger Temperatur auf stetig höhere Temperatur geregelt, höchstens bis $T_1 = T_2$ reicht ist. Auf diese Weise durchläuft jedes Molekül den

Temperaturgradienten, unabhängig von seiner Wanderungsgeschwindigkeit bzw. Größe.

5

- 10 b) Renaturierungsexperimente, wie sie in der Figur 16b und 16c schematisch beschrieben sind, ergeben nur dann scharfe Bandensignale, wenn nicht allein ein räumlicher Temperaturgradient durchlaufen wird. In diesem Fall kommt es nämlich zu einem unerwünschten Effekt der Bandenverbreiterung bei der Rückfaltung, der umso störender ist, je steiler die Denaturierungskurve verläuft. In diesem Fall wird die Front der
- 15 Bande gegenüber dem Bandenende stark beschleunigt, da rückseitig eine niedrigere Temperatur herrscht. Im Ergebnis wird die Bande diffus. Der Effekt ist hingegen sehr erwünscht, wenn umgekehrt die Bandenfront in Laufrichtung gesehen relativ bei höheren Temperaturen läuft. Erfindungsgemäß läßt sich dies auch bei
- 20 Renaturierungsexperimenten erreichen durch Kombination räumlicher und zeitlicher Gradienten. Anstelle einer Renaturierung in einem linearen T-Gradienten, wie er z.B. mit einer Vorrichtung gemäß Figur 1 durchgeführt werden kann, kann die Probe in einem relativ steigen-
- 25 den Gradienten zwischen T_1 und T_2 (Figur 10) in den Zeiten t_0 bis t_3 (Figur 16b und c) der Elektrophorese unterworfen und analysiert werden, wobei jedoch beide Temperaturen gemeinsam (Figur 16b) oder nur T_1 (Figur 16c) in einem Maße herabgesetzt werden, daß die Probe
- 30 mit der Laufzeit einer niedrigeren Temperatur ausgesetzt ist, die Bandenfront jedoch immer eine höhere Temperatur hat als ihre Rückseite. Auf diese Weise tritt erfindungsgemäß eine Bandenschärfung ein.

Das erfindungsgemäße Verfahren und die erfindungsgemäße Vorrichtung können sowohl zur analytischen Erfassung und quantitativen Erfassung als auch zur Präparation von Komponenten aus Stoffgemischen verwendet werden. Die

Analyse und Präparation können an vielen Proben simultan durchgeführt werden; Detektion und Auswertung können automatisch erfolgen. Insbesondere eignen sich Verfahren
5 und Vorrichtung zur Präparation und Analyse von Viroiden, viralen Nukleinsäuren, Satelliten-RNA, zur Analyse von Mutationen in Nukleinsäuren, zur Analyse von Mutationen in Proteinen und zur Analyse von Protein-Nukleinsäure-Komplexen.

10

Die TGGE erweist sich zur Präparation von Varianten als besonders vorteilhaft, da die direkte Sequenzierung von Varianten möglich wird ohne vorherige Klonierung. Dies wird ermöglicht durch Elution geringster Mengen einer
15 spezifischen Variante, die einer enzymatischen Amplifikation und nachfolgender Sequenzierung unterworfen wird. Solche Arbeitsweisen werden in Zukunft an Bedeutung gewinnen, da durch Sicherheitsauflagen das Arbeiten mit sonst zur Amplifikation verwendeten Vektoren und das
20 Arbeiten mit rekombinanten Organismen erschwert wird.

25

30

P a t e n t a n s p r ü c h e

- 5 1. Verfahren zur Trennung und Detektion von Komponenten eines Stoffgemisches durch Temperaturgradienten-Gel-
- elektrophorese (TGGE), dadurch gekennzeichnet, daß
- entweder
- 10 - ein räumlicher Temperaturgradient in Richtung des zur Trennung verwendeten elektrischen Feldes durch mindestens zwei räumlich voneinander entfernte Temperaturniveaus aufgebaut wird oder
- ein zeitlicher Temperaturgradient durch zeitliche Variation der Temperatur eines Temperaturniveaus
- 15 aufgebaut wird oder
- ein Temperaturgradient durch Kombination des räumlichen und zeitlichen Temperaturgradienten aufgebaut wird,
- 20 - der Temperaturgradient leitend in die Gelmatrix übertragen wird,
- die Temperaturniveaus zum Aufbau des räumlichen Temperaturgradienten durch regelbare Heiz- oder Kühl-
- 25 vorrichtungen eingestellt werden, wobei Orte gleichen elektrischen Potentials identische Temperaturen aufweisen, oder
- zum Aufbau des zeitlichen Temperaturgradienten an jedem Ort der Trennstrecke in dem Trennmedium das
- Temperaturniveau in zeitlicher Abhängigkeit mittels
- 30 einer oder mehrerer regelbarer Heiz- oder Kühlvorrichtungen frei wählbar einstellbar ist und ggf.
- am Ende der Trennstrecke die getrennten Komponenten detektiert werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Zeit, in der die Temperaturänderungen stattfinden, kürzer ist als die Zeit des Durchlaufs der Komponenten des zu trennenden Gemisches durch das Trennmedium während der Elektr phorese.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektrophorese für die Dauer der Temperaturäquilibrierung abgeschaltet wird.
5
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Temperatur im Bereich von 0 bis 100°C regelbar ist.
- 10 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Temperaturregelung der Temperaturniveaus durch thermostatisierte Flüssigkeitsbäder, Peltierheizungen oder elektrische Heizungen erfolgt.
15
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß sich das Trennmedium in einem zylindrischen Hohlkörper oder auf einem flächigen Träger befindet.
20
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß sich das Trennmedium in einem Glas- oder Kunststoffröhrchen befindet oder der flächige Träger eine Metallplatte mit einer darauf befindlichen Folie ist.
25
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektion der Komponenten automatisch erfolgt.
30
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die zu trennenden Komponenten geladene Biopolymere sind.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die zu trennenden Komponenten Nukleinsäuren oder Proteine sind.

- 5 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektrophorese in einer polymeren Mediumstruktur, vorzugsweise an Polyacrylamid als Trennmedium oder in einem trägerfreien Medium durchgeführt wird.
- 10 12. Verfahren zur qualitativen und quantitativen Detektion von Mutationen von Nukleinsäuren durch Analyse des durch Hybridisierung des die Mutation aufweisenden Nukleinsäurefragments (Mutante) mit dem diese Mutation nicht aufweisenden Nukleinsäurefragment (Wildtyp) gewonnenen Heteroduplexes, wobei das die Mutation tragende, zu untersuchende Nukleinsäurefragment so gewählt wird, daß die Mutation in einer thermodynamisch instabilen Region des Heteroduplexes liegt.
- 15 13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei die Auswahl der die Mutation enthaltenden thermodynamisch instabilen Region durch Berechnung erfolgt.
- 20 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 und/oder 13, wobei das zu untersuchende Nukleinsäurefragment so gestaltet wird, daß die Mutation in der thermodynamisch instabilsten Region liegt.
- 25 15. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 14, wobei die thermodynamisch stabilere Region des Nukleinsäurefragments endständig Oligo-G- und/oder -C-Nukleotide trägt.
- 30 16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die Anzahl der G- und/oder C-Nukleotide 20 bis 30 beträgt.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 16, wobei die Nukleinsäuren durch Polymerase Chain Reaction (PCR) amplifiziert werden.

- 5 18. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 17, wobei die beiden verwendeten Oligonukleotide in unmittelbarer Nachbarschaft zur nachzuweisenden Mutation an die zu amplifizierende DNA hybridisieren.
- 10 19. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 18, wobei die zu untersuchenden Heterduplices nach Probenvorbereitung einer Temperaturgradienten-Gelelektrophorese (TGGE) unterzogen werden.
- 15 20. Verfahren nach Anspruch 19, wobei der Temperaturgradient senkrecht zur Richtung des elektrischen Feldes verläuft.
- 20 21. Verfahren nach Anspruch 19, wobei der Temperaturgradient parallel zur Feldrichtung des elektrischen Feldes verläuft.
- 25 22. Verfahren nach Anspruch 21, wobei der Temperaturgradient zeitlich variiert wird.
- 30 23. Verfahren nach Anspruch 22, wobei der Temperaturgradient von einem höheren Temperaturniveau kathodenseitig des elektrischen Feldes ausgeht, das über dem Schmelzpunkt der thermodynamisch instabilen Region der Heteroduplices liegt, und zeitlich in Richtung zum Niveau des anodenseitig liegenden tieferen Temperaturniveaus reguliert wird.
24. Verfahren nach Anspruch 21, wobei das anodenseitige Temperaturniveau des statischen Temperaturgradienten höher liegt als das Temperaturniveau der Kathodenseite.
25. Verfahren nach Anspruch 21, wobei das kathodenseitige Temperaturniveau des statischen Temperaturgradienten höher liegt als das Temperaturniveau der Anodenseite.

- 37 -

26. Oligonukleotid mit 5'-terminalen Affinitätsgruppen.
- 5 27. Oligonukleotid nach Anspruch 26, wobei als Affinitätsgruppe zwei bis acht Histidinreste 5'-terminal gebunden sind.
- 10 28. Oligonukleotid nach Anspruch 27, wobei die Anzahl der Histidinreste sechs beträgt.
29. Oligonukleotid nach Anspruch 26, wobei als Affinitätsgruppe Biotinylreste 5'-terminal gebunden sind.
- 15 30. Oligonukleotid nach einem der Ansprüche 26 bis 29, enthaltend zusätzlich eine Restriktionsschnittstelle und/oder eine G/C-reiche Box und/oder eine A/T-reiche Box und eine mit der zu untersuchenden Nukleinsäuresequenz hybridisierende Sequenz.
- 20 31. Verwendung des Oligonukleotids nach einem der Ansprüche 26 bis 30 als Primer in der PCR zur Amplifizierung der zu untersuchenden Nukleinsäuren und/oder in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 25.
- 25 32. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 25, wobei die die Mutation tragende Nukleinsäure unter Verwendung des Oligonukleotids nach einem der Ansprüche 26 bis 30 amplifiziert wird, an einem zu den Affinitätsgruppen der Oligonukleotide nach Ansprüchen 26 bis 30 an fester Phase fixierten affinen Material gebunden wird, sodann in Gegenwart gewünschtenfalls markierter, die Mutation nicht aufweisender Nukleinsäure-Einzel- oder -Doppelstränge mindestens einem Denaturierungs-/Renaturierungszyklus unterworfen wird, anschließend eluiert und danach dem Trennungsvorgang unterworfen wird.
- 30

- 5 33. Verfahren nach Anspruch 32, wobei das zu der Affinitätsgruppe des Oligonukleotids nach Anspruch 26 affine Material ein polymerer Träger ist, der ein Chelat aus einem Chelatbildner und einem Übergangsmetallion enthält.
- 10 34. Verfahren nach Anspruch 33, wobei das zu der Affinitätsgruppe des Oligonukleotids affine Material ein polymerer Träger ist, der ein Chelat aus über kovalent an den Träger gebundener Nitrilotriessigsäure und Nickel²⁺ enthält.
- 15 35. Verfahren nach Anspruch 32, wobei das zu der Affinitätsgruppe des Oligonukleotids nach einem der Ansprüche 26 bis 30 affine Material ein polymerer Träger ist, der kovalent gebundenes Avidin oder Streptavidin aufweist.
- 20 36. Verfahren nach einem der Ansprüche 32 bis 35, wobei der polymere Träger eine Membran oder ein partikelförmiges Material ist.
- 25 37. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 12 bis 25 und/oder 32 bis 36 zur Auffindung und Charakterisierung von Mutationen in DNA oder RNA wie Punktmutationen, Deletionen, Insertionen und Umstellungen der Nukleinsäurekette.
- 30 38. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 12 bis 25 und/oder 32 bis 36, wobei das Probenmaterial aus lebendem, totem fossilem und in vivo nicht mehr stoffwechselaktivem Gewebe stammt.
39. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 12 bis 25 und/oder 32 bis 36 zur Durchführung genetischer Studien wie forensische Analytik, Aufklärung

von Erbkrankheiten und/oder genetisch charakterisi-
ter Anomalien, Individuenanalytik, Fingerprinting.

5

40. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche
12 bis 25 und/oder 32 bis 36, wobei Feincharakteri-
sierungen von Stammabweichungen in der industriellen
Mikrobiologie, bei medizinisch relevanten Krankheits-
erregern, den Viren, insbesondere bei den für häufige
Mutationen bekannten Viren, Bakterien, Pilzen und
Einzellern durchgeführt werden.

10

41. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche
12 bis 25 und/oder 32 bis 36, wobei evolutionäre
Entwicklungsstudien betrieben werden.

15

42. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche
12 bis 25 und/oder 32 bis 36 zur präparativen Her-
stellung gefundener Mutanten, wobei eine Mutante als
einzelne Bande in der Detektionseinheit aufgespürt
wird und direkt oder durch Richtungsänderung der
Spannungsgradienten im Rahmen einer Elektroelution
isoliert, direkt PCR-amplifiziert oder direkt sequen-
ziert und/oder kloniert wird.

20

25

43. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche
12 bis 25 und/oder 32 bis 36 zur Bestimmung und Zu-
ordnung von Individuen, wobei genetisch amplifizierte
Gensegmente, insbesondere solche aus Einzel-Kopie-
Regionen des Genoms, mit einem homogenen Standardseg-
ment hybridisiert werden oder mit homologen Sequenzen
einer auf Identität des zugehörigen Individuums zu
prüfenden, analog genetisch amplifizierten DNA hybri-
disiert werden.

30

44. Mittel zur Durchführung des Verfahrens nach einem
der Ansprüche 12 bis 25 und/oder 32 bis 36, bestehend

aus einem Gemisch von Reagenti n wie einer oder mehre-
rer markierter Nukleinsäuresonden, einer teilweise
oder vollständig homologen Standardnukleinsäure in
5 nicht markierter Form sowie einem Hybridisierungspuffer, der im Temperaturbereich zwischen 0 und 100°C
Denaturierung und Renaturierung von Doppelstrangstruk-
turen erlaubt.

10 45. Mittel zur Durchführung des Verfahrens nach einem
der Ansprüche 12 bis 25 und/oder 32 bis 36, bestehend
aus einem Gemisch von mindestens einer markierten
Nukleinsäuresonde, einer teilweise oder vollständig
15 homologen Standardnukleinsäure in nicht markierter
Form sowie einem Hybridisierungspuffer, der im Tempe-
raturbereich zwischen 0 und 100°C Denaturierung und
Renaturierung von Doppelstrangstrukturen erlaubt.

20 46. Mittel gemäß Anspruch 45, wobei das Gemisch einen
Festphasenträger nach einem der Ansprüche 32 bis 36
enthält, mit dessen Hilfe amplifizierte Segmente
direkt dem Reaktionsgemisch entzogen werden können.

25 47. Verfahren zur quantitativen Detektion von Mutanten
oder spezifischen Gensequenzen, wobei einem Gemisch
differierender Sequenzen, deren eine Konzentration
bekannt ist, im Unterschuß ein Marker-Nukleinsäure-
molekül zugesetzt wird, dessen Sequenz mit der Se-
30 quenz eines der vorgenannten Sequenzen identisch ist
und dieses Gemisch mindestens einem Denaturierungs-
und Renaturierungszyklus unterworfen und analysiert
wird.

48. Verfahren nach Anspruch 47, wobei die Sequenz der
markierten Nukleinsäure mit der Sequenz der Nuklein-
säure, deren Konzentration b kannt ist, identisch
ist.

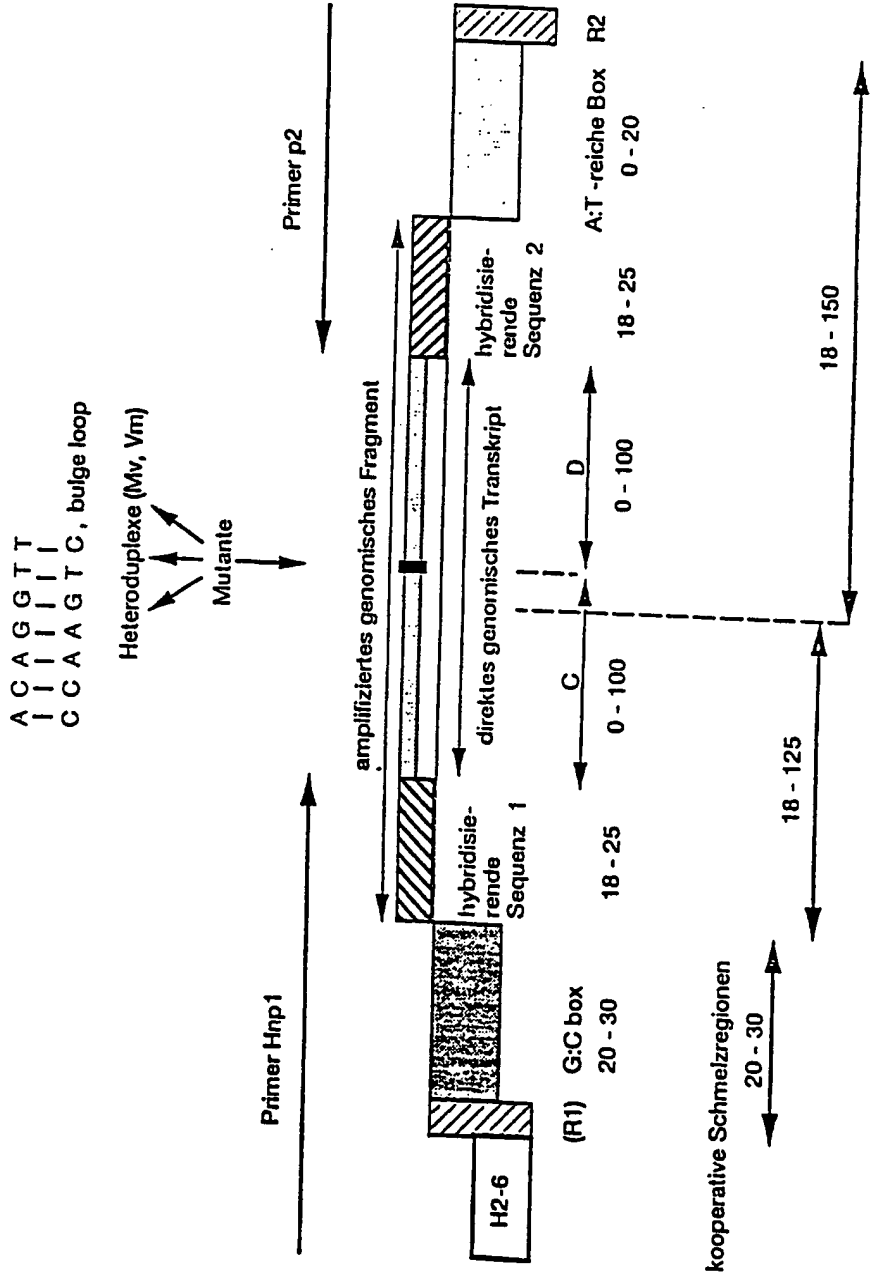
- 5 49. Verfahren nach Anspruch 47 und/oder 48, wobei die nach einem Denaturierungs-/Renaturierungszyklus gebildeten Hybride mittels Temperaturgradientengelelektrophorese (TGGE) getrennt werden und deren relative Signalintensitäten gemessen werden.
- 10 50. Verfahren nach einem der Ansprüche 47 bis 49, wobei die zu analysierenden Nukleinsäuren durch enzymatische Amplifikation erhalten worden sind.
- 15 51. Vorrichtung zur Durchführung der Temperaturgradientengelelektrophorese (TGGE), dadurch gekennzeichnet, daß zwischen mindestens zwei einen Temperaturgradienten aufbauenden Heiz- oder Kühlvorrichtungen (1, 2) mit Wärmereservoir (4, 5), bei mehr als zwei Heiz- oder Kühlvorrichtungen zwischen den entferntesten Heiz- oder Kühlvorrichtungen, ein Hohlkörper (6),
20 der die Heiz- oder Kühlvorrichtungen durchdringt, angeordnet ist, welcher das zur Trennung verwendete Trennmedium in seinem Lumen enthält, und daß der Hohlkörper (6) von einem wärmeleitenden Thermostatiermantel (7) umgeben ist, der mit mindestens einer der
25 Heiz- und/oder Kühlvorrichtungen (1, 2) thermisch verbunden ist.
- 30 52. Vorrichtung nach Anspruch 51, dadurch gekennzeichnet, daß der Hohlkörper (6) zylindrisch ausgebildet ist.
53. Vorrichtung nach Anspruch 51 und/oder 52, dadurch gekennzeichnet, daß der Hohlkörper (6) eine Kapillare ist.
54. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 51 bis 53, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen der äußeren Wand des Hohlkörpers (6) und der inneren Wand des Thermostatiermantels (7) ein Wärmeaustauscher (8) vorgesehen ist.

55. Vorrichtung nach Anspruch 54, dadurch gekennzeichnet,
daß der Wärmeaustauscher (8) aus einer viskosen Flüssigkeit besteht.
56. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 51 bis 55, dadurch gekennzeichnet, daß die Heiz- oder Kühlvorrichtungen ein thermostatisiertes Flüssigkeitsbad und Peltierheizungen (9) oder elektrische Heizungen und/oder ein Wärmereservoir (4, 5) aufweisen.
57. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 51 bis 56, dadurch gekennzeichnet, daß der Thermostatierring (7) mit allen Heiz- oder Kühlvorrichtungen (1, 2) wärmeleitend verbunden ist.
58. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 51 bis 57, dadurch gekennzeichnet, daß eine dritte Heiz- oder Kühlvorrichtung (3) an der Probenaufnahmeseite vorgesehen ist.
59. Vorrichtung nach Anspruch 58, dadurch gekennzeichnet, daß der Thermostatierring (7) von der zweiten Vorrichtung (2) thermisch entkoppelt ist.
60. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 51 bis 59, dadurch gekennzeichnet, daß die Heiz- oder Kühlvorrichtungen (1, 2) zeitlich regelbar sind.
61. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 51 bis 60, dadurch gekennzeichnet, daß die Heiz- oder Kühlvorrichtungen (1, 2) mit den entsprechenden Wärmereservoirs (4, 5) eine Vielzahl von Hohlräumen (6) aufnehmen, indem die Vorrichtungen (1, 2) und (4, 5) blockartig (4a, 5a) ausgestaltet sind und eine Vielzahl von Durchbohrungen (11) aufweisen, durch die die Hohlräume (6) hindurchragend angeordnet sind.

- 5 62. Vorrichtung nach Anspruch 61, dadurch gekennzeichnet,
daß die Hohlkörper (6) endseitig über die blockartig
ausgestalteten Vorrichtungen (4a, 5a) hinausragen.
- 10 63. Verwendung der Vorrichtung nach einem der Ansprüche
51 bis 62 zur Trennung von Stoffgemischen, in denen
mindestens eine Komponente im Temperaturbereich des
Temperaturgradienten eine thermische Umwandlung er-
fährt.
- 15 64. Verwendung der Vorrichtung nach einem der Ansprüche
51 bis 62 in dem Verfahren nach einem der Ansprüche
1 bis 62.
- 20 65. Verwendung der Vorrichtung nach einem der Ansprüche
51 bis 62 zum Nachweis und zur Unterscheidung von
Viroiden, viralen Nukleinsäuren, Satelliten-RNA, zur
Analyse von Mutationen in Nukleinsäuren, zur Analyse
von Mutationen in Proteinen und zur Analyse von Pro-
tein-/Nukleinsäure-Komplexen.
- 25 66. Verwendung der Vorrichtung nach einem der Ansprüche
51 bis 62 zur Präparation von Komponenten des zu
trennenden Stoffgemisches.
- 30 67. Verwendung der Vorrichtung nach einem der Ansprüche
51 bis 62 zur Präparation von Viroiden, viralen
Nukleinsäuren, Satelliten-RNA, zur Präparation von
mutierten Nukleinsäuren in Homo- und Heteroduplices,
zur Präparation von Proteinen und zur Präparation
von Protein-/Nukleinsäure-Komplexen.

Fig. 1

Generelles Sondendesign zur TGGE - Analyse genomischer Mutationen



2/18

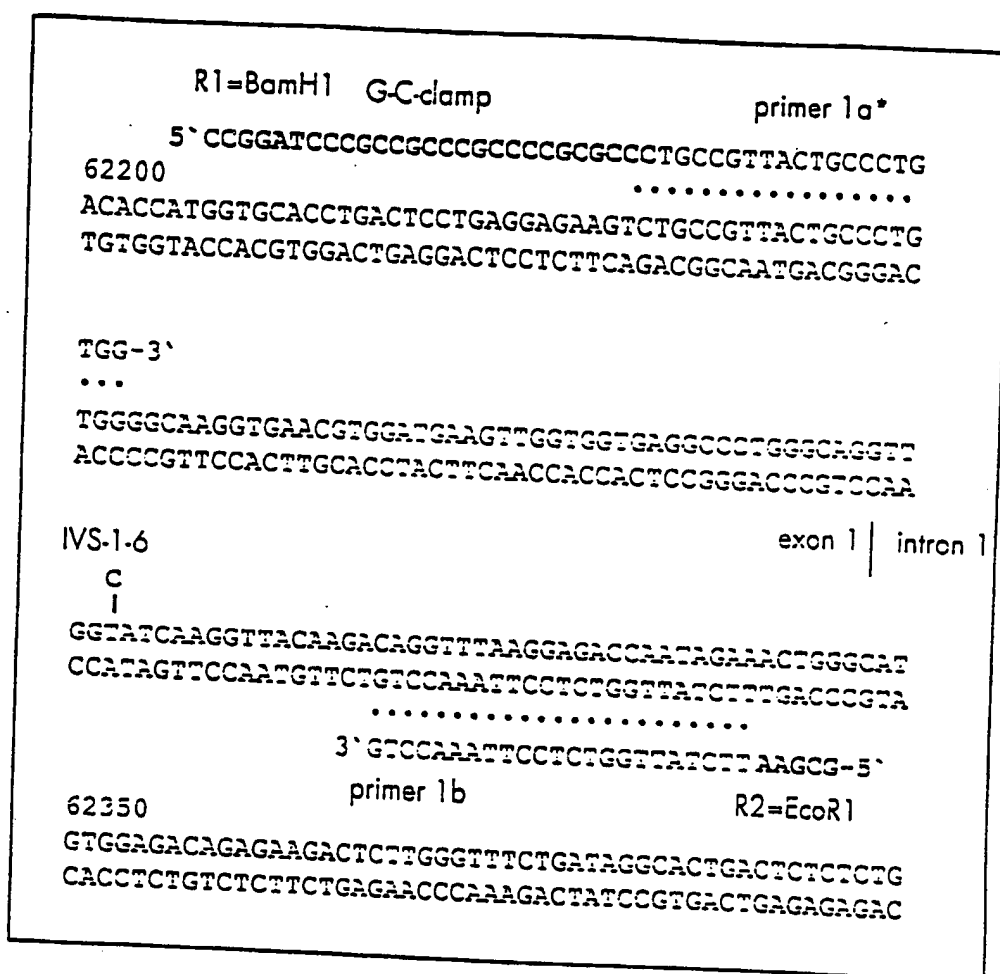


Fig. 2

3/18

Fig. 3

DUBO: (USERS:STEGEER.SEO) HUMHBB_PRENHNA.LIS;3

GenBank: HUMHBB 62155 - 63760 : pre-mRNA
62205 - 62296 : Exon1
62427 - 62649 : Exon2
63300 - 63628 : Exon3

This file: 62155 - 62649 = 1 - 495
51 - 142 : Exon2
272 - 495 : Exon3

1 ACATTGCTT CTGACACAAC TGTGTTCAC AGCAACCTCA AACAGACACC
51 ATGGTGACC TGACTECTGA GGAGAAGTCT GCCGTTACTG CCCTGTGGGG
101 CAAGGTGAAC GTGGATGAAG TTGGTGGTGA GGGCCGTGGC AGGTTGGTAT
151 CAAGGTTACA AGACAGGTTT AAGGAGACCA ATAGAACTG GGCATGTGGA
201 GACAGAGAAG ACTCTTGGGT TTCTGATAGG CACTGACTCT CTCTGGCTAT
251 TGGTCTATTT TCCGACCTT AGGCTGCTGG TGGTCTACCC TTGGACCCAG
301 AGGTTCTTTG AGTCTTTTGG GGATCTGTCC ACTCTGTATG CTGTTATGGG
351 CAACCTTAAG GTGAAGGTC ATGGCAAGAA AGTGTGGGT GCGTTTAAAG
401 ATGGCTGGC TCACCTGGAC AACCTCAAGG GCACCTTTGC CACACTGAGT
451 GAGCTGCACT GTGACAAGCT GCACGTGGAT CCGAGAAGT TCAGG

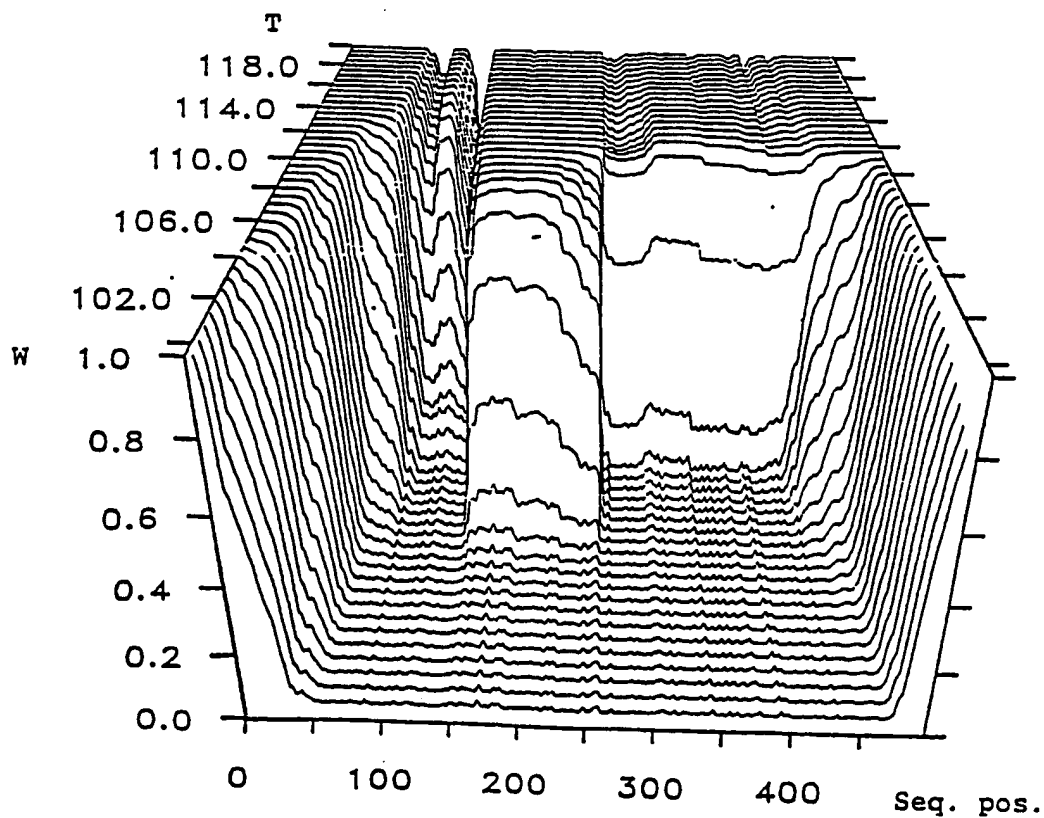


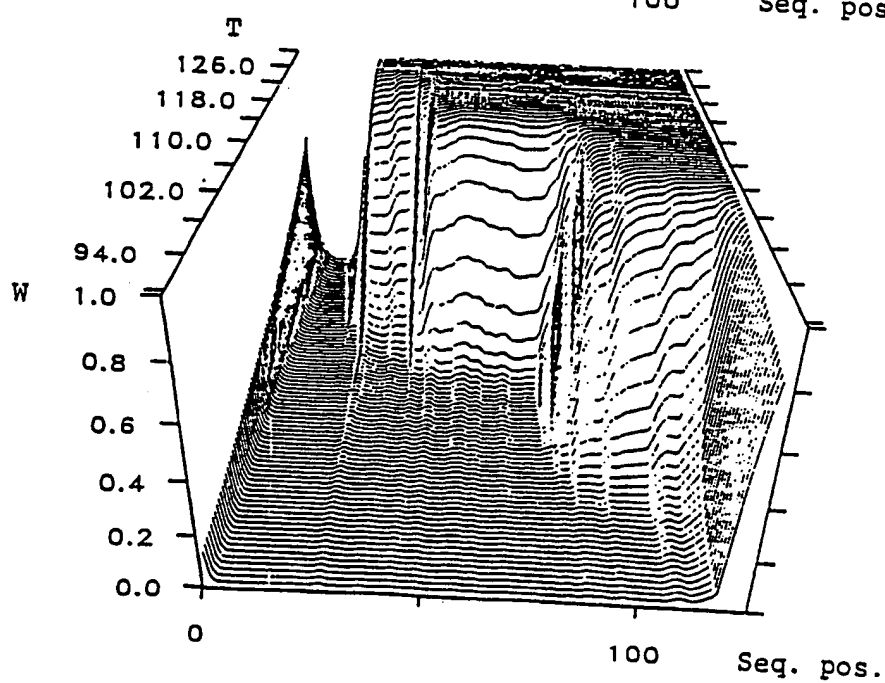
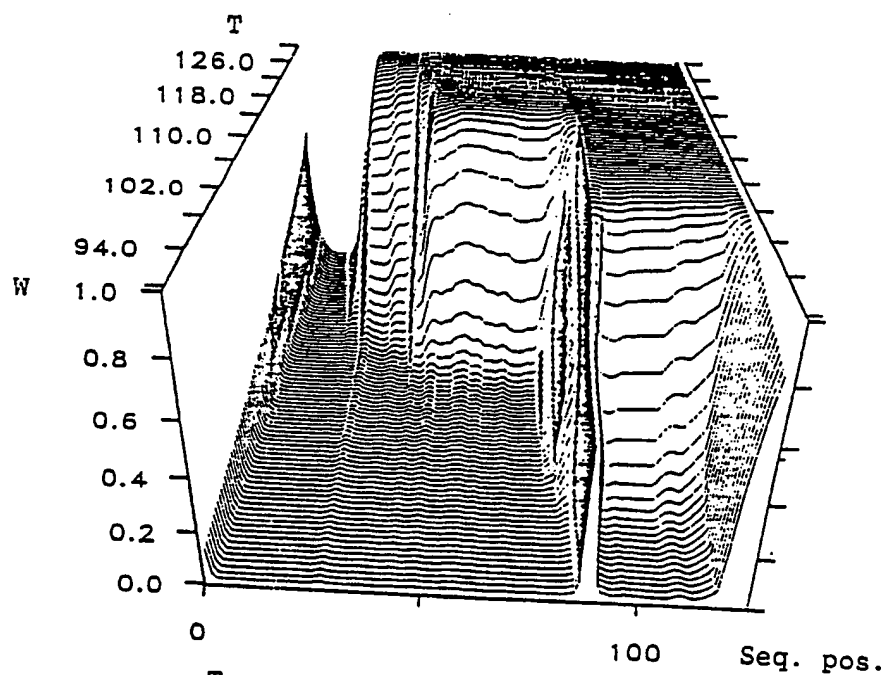
Fig. 4

DUBO: (USERS.STEGER.SEG)KARSTEN9.LIS;1

125 GenBank:HM0888 GC-clamp + P1a/62233-62338(=P1b)

CTGCCGTTACTGCGCTGTGGGCAAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTGGTCAGGCCCTGGGCAGTTGGTATCAAGGTTACAAGACAGTTTAAAGACACCAATAG

pot. Mut. bei 62302(= Position 29): $T \xrightarrow{!} C$



5/18

Fig. 5a

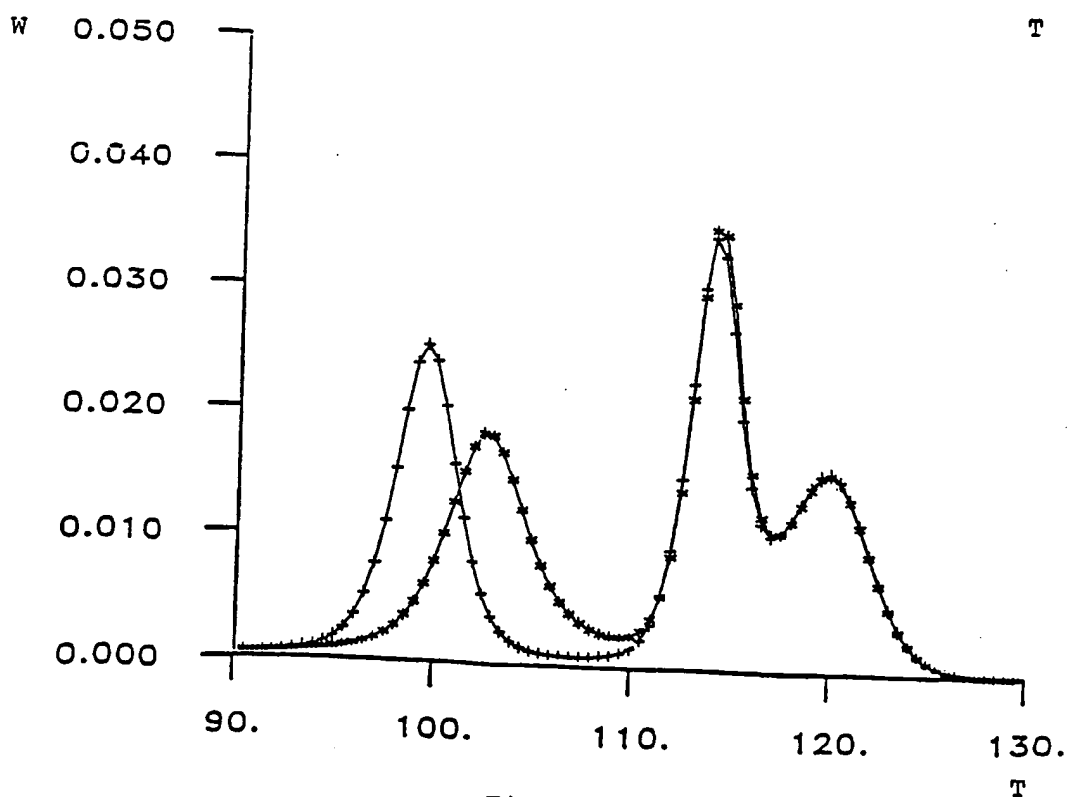
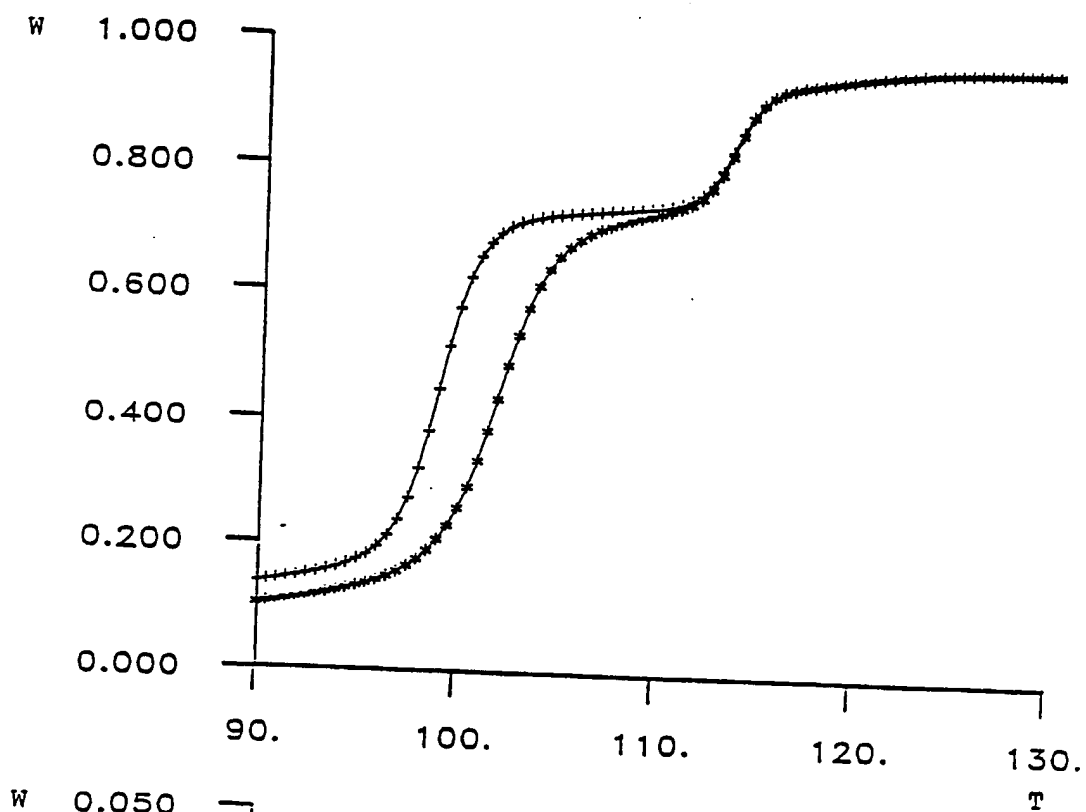
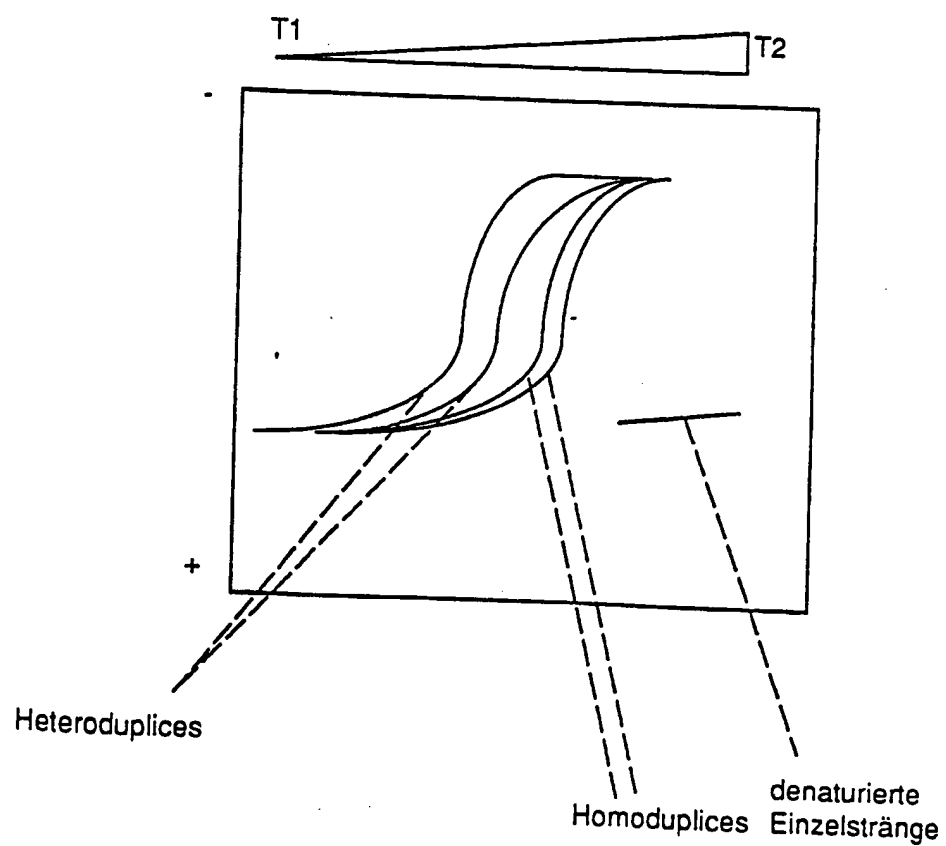
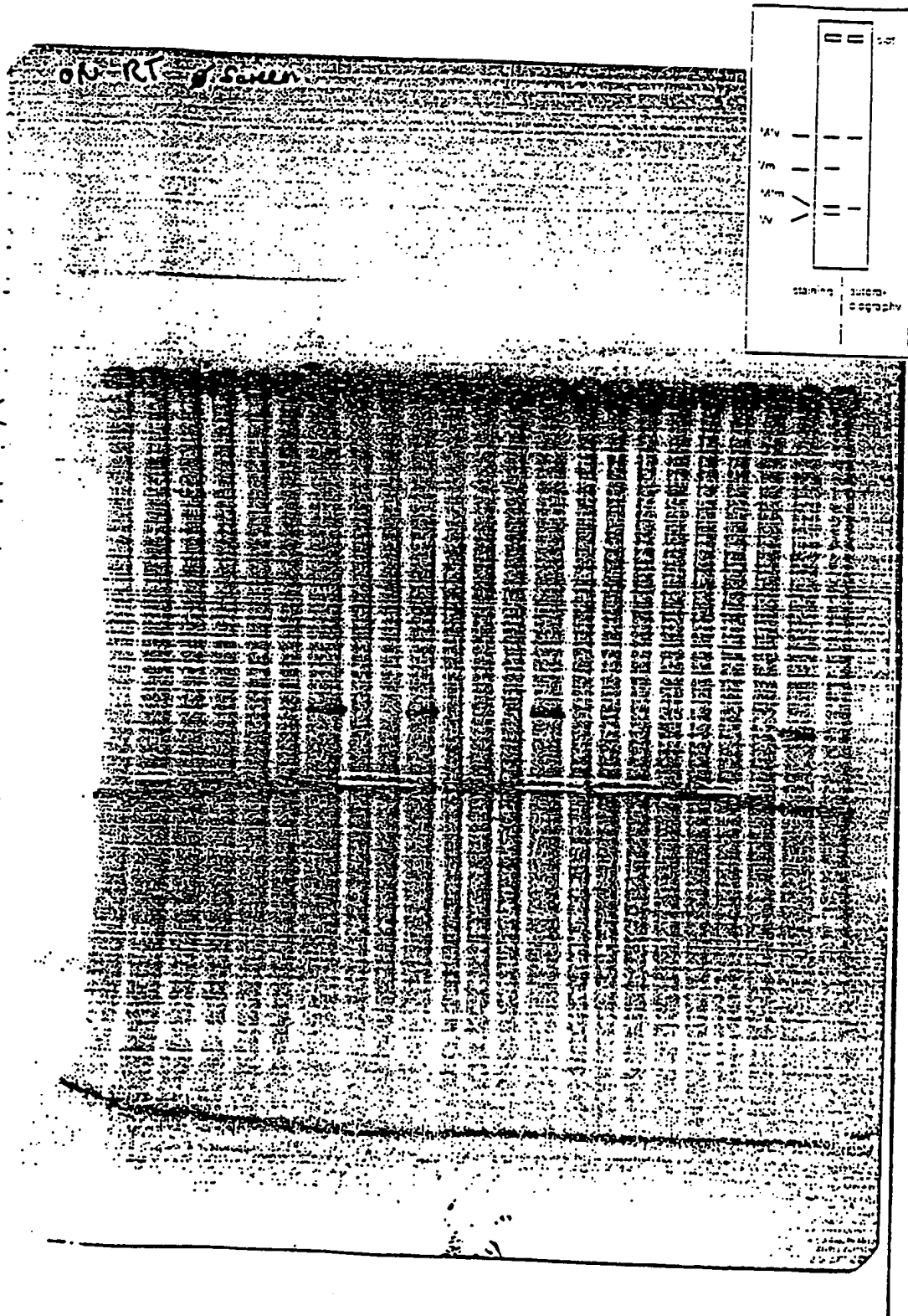
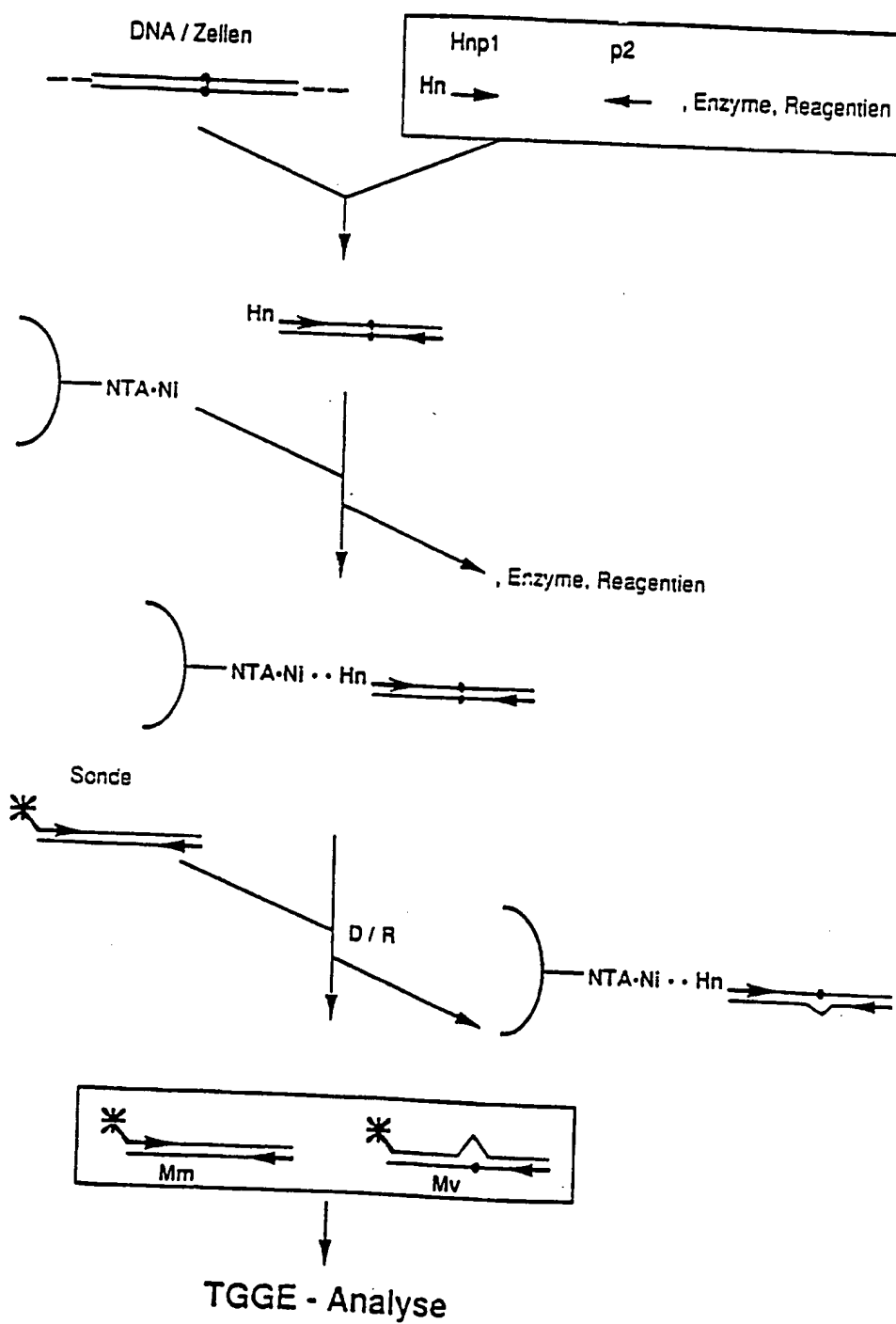


Fig. 5b





Amplifikation und TGGE-Probenvorbereitung



TGGE Bestimmung der PCR -template Kopienzahl / Anfangskonzentration

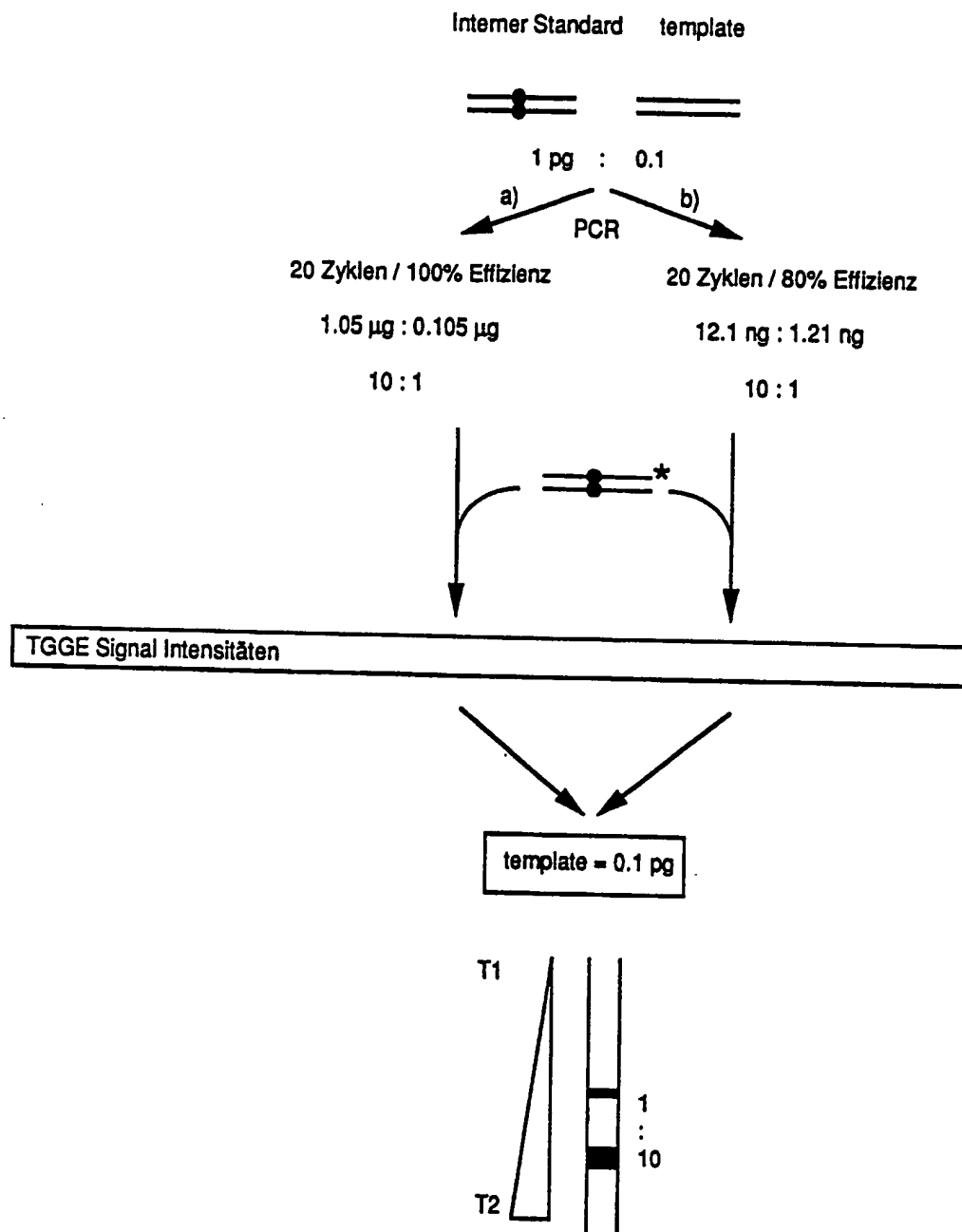


Fig. 9

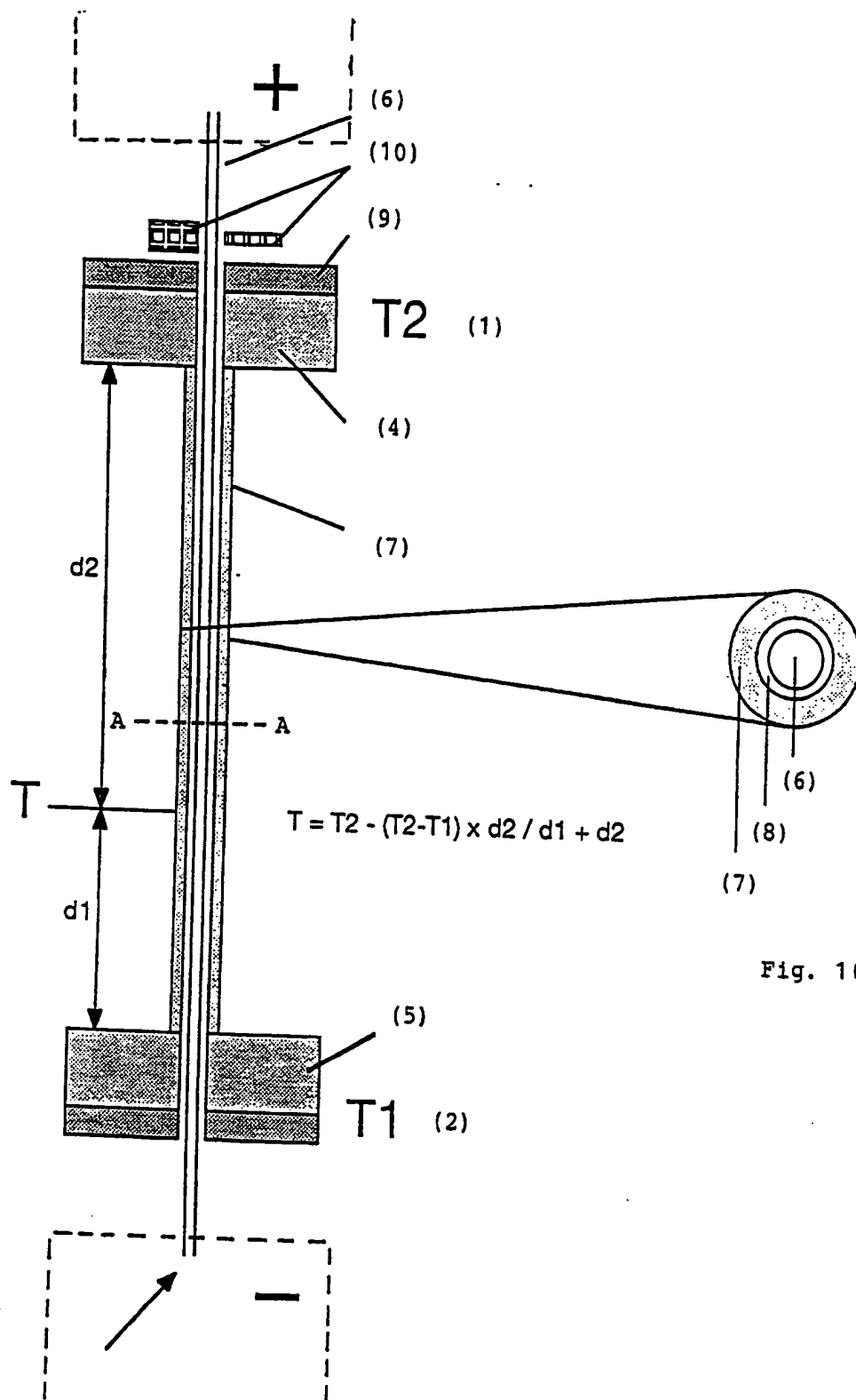


Fig. 10a

Fig. 10

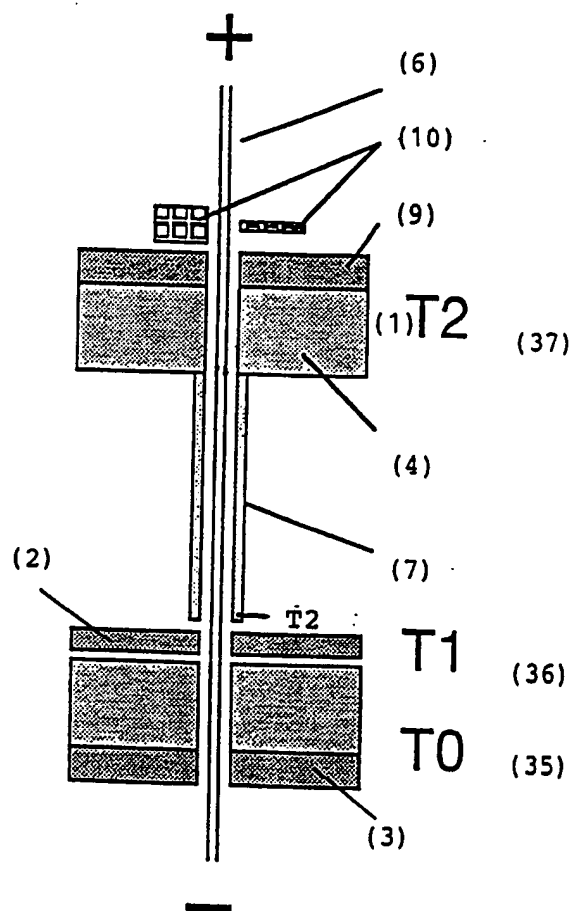


Fig. 11

Multikanal - Version im Mikrotiterformat

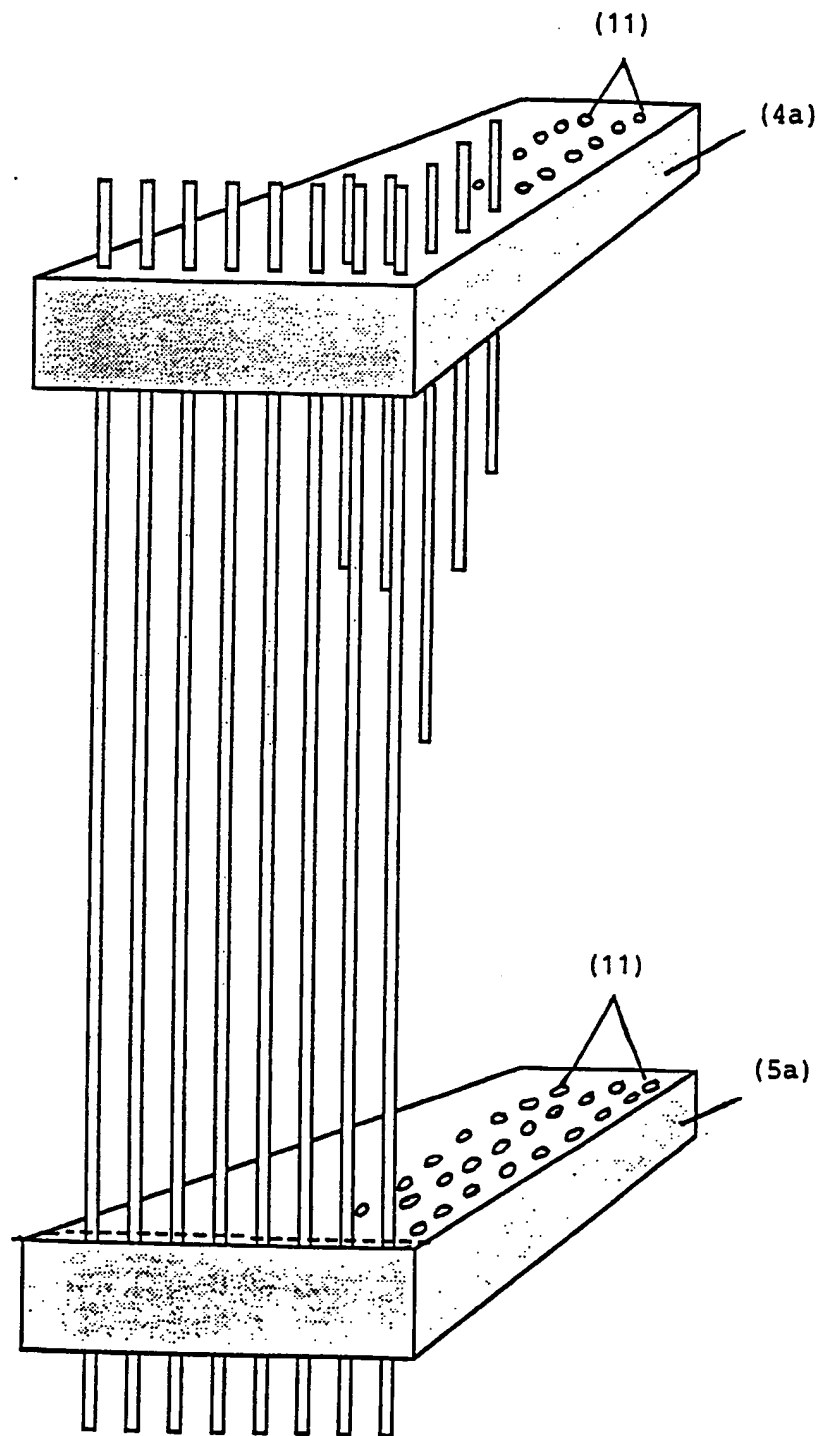


Fig. 12

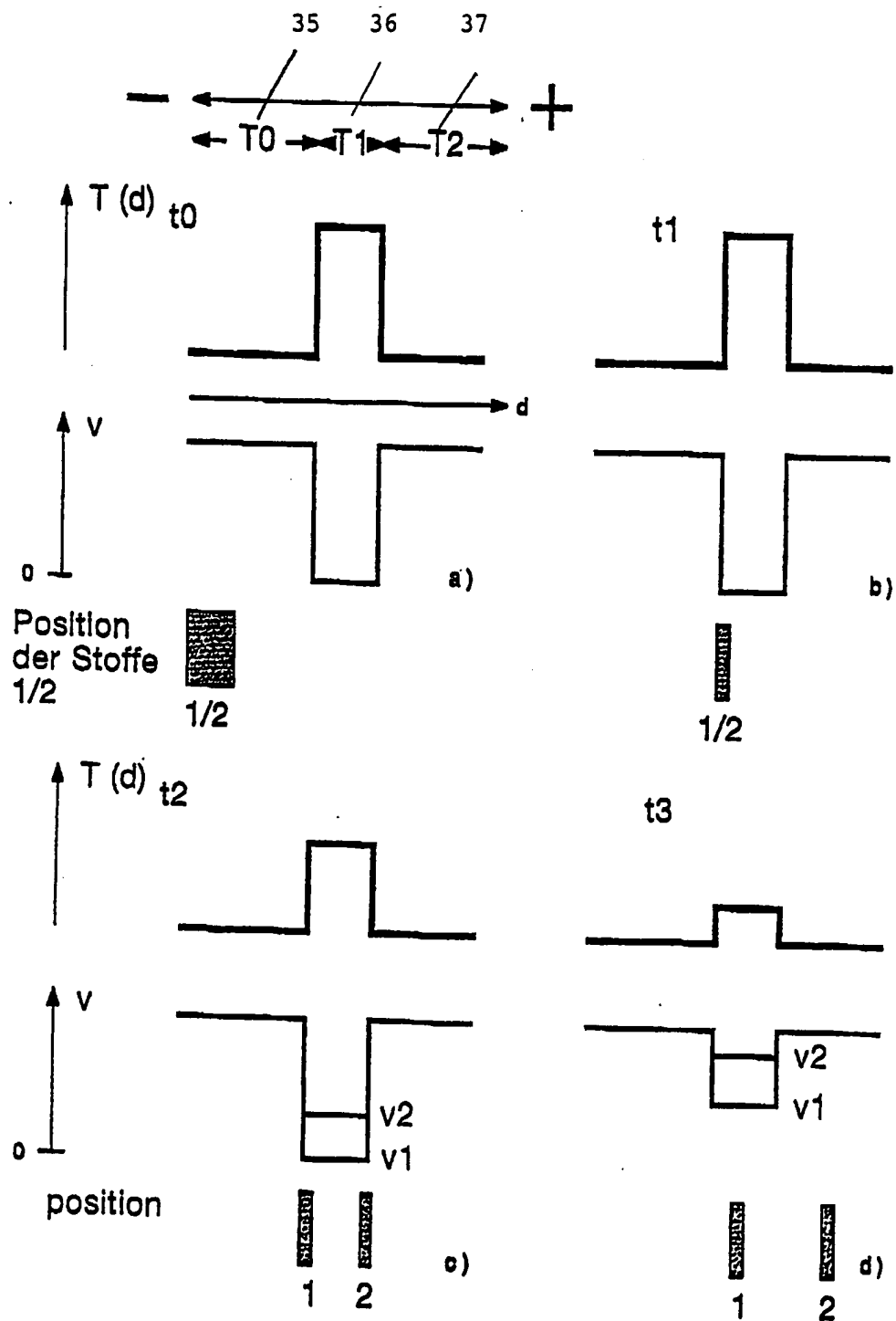


Fig. 13 a-d *

14/18

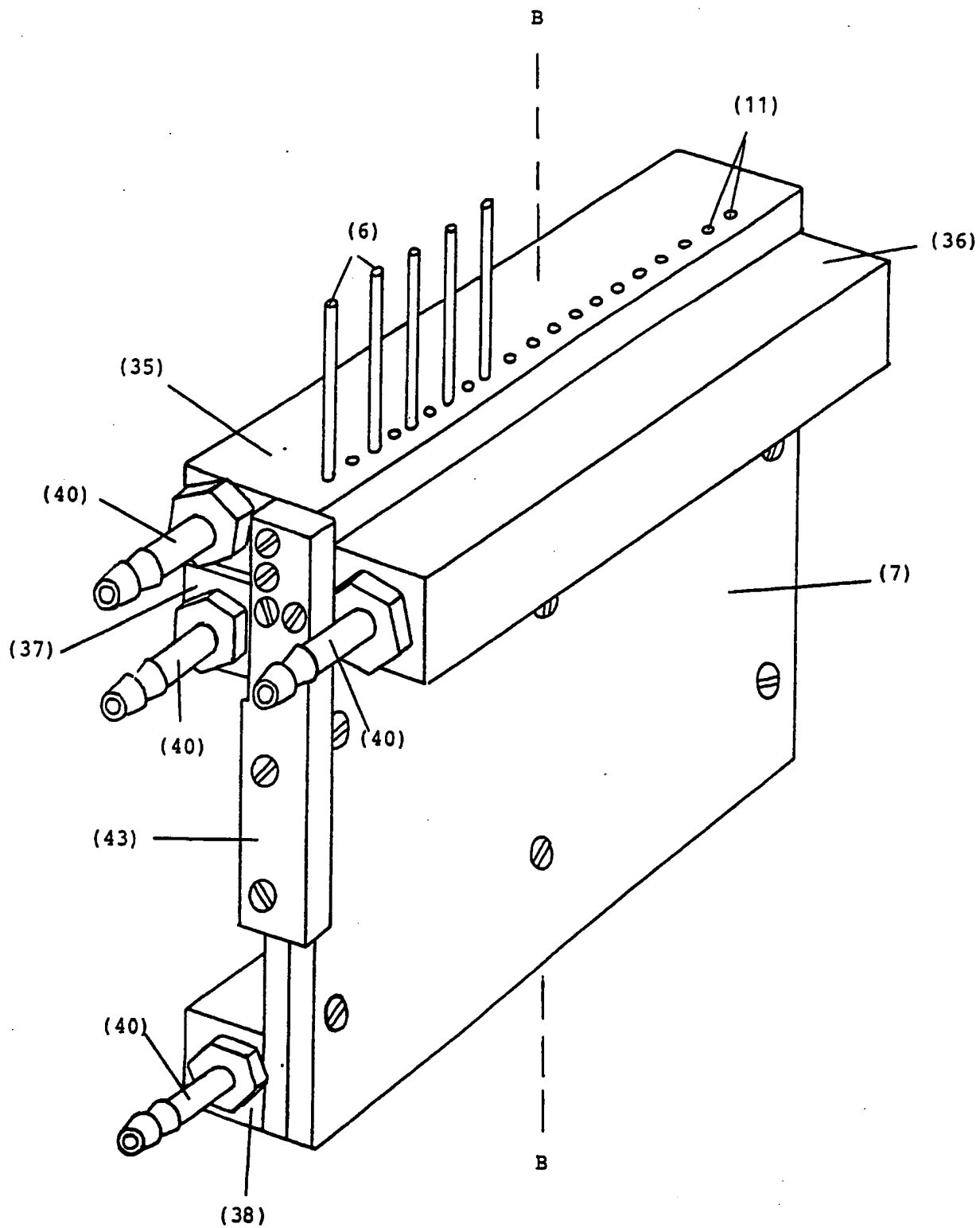


Fig. 14

15/18

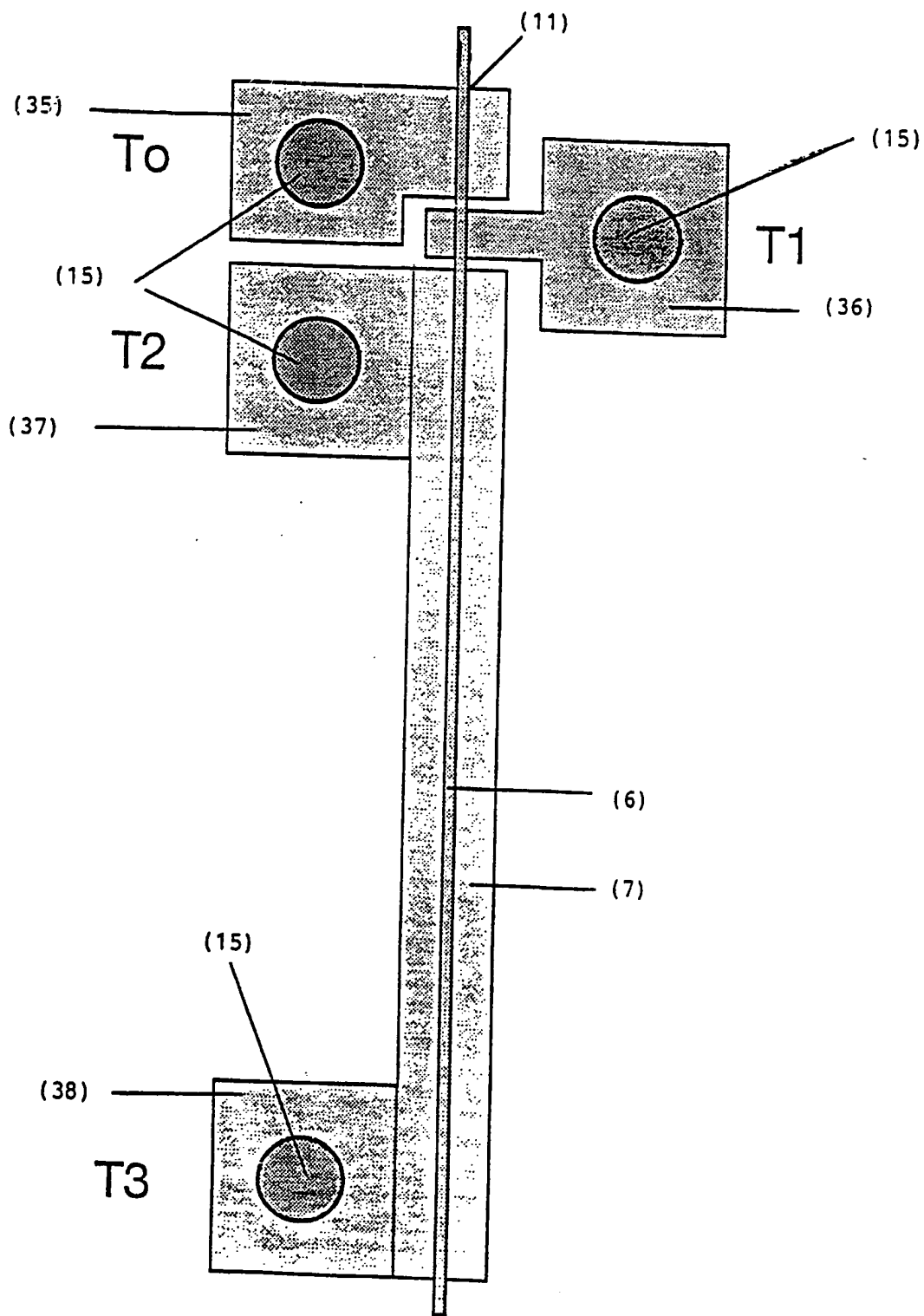


Fig. 14a

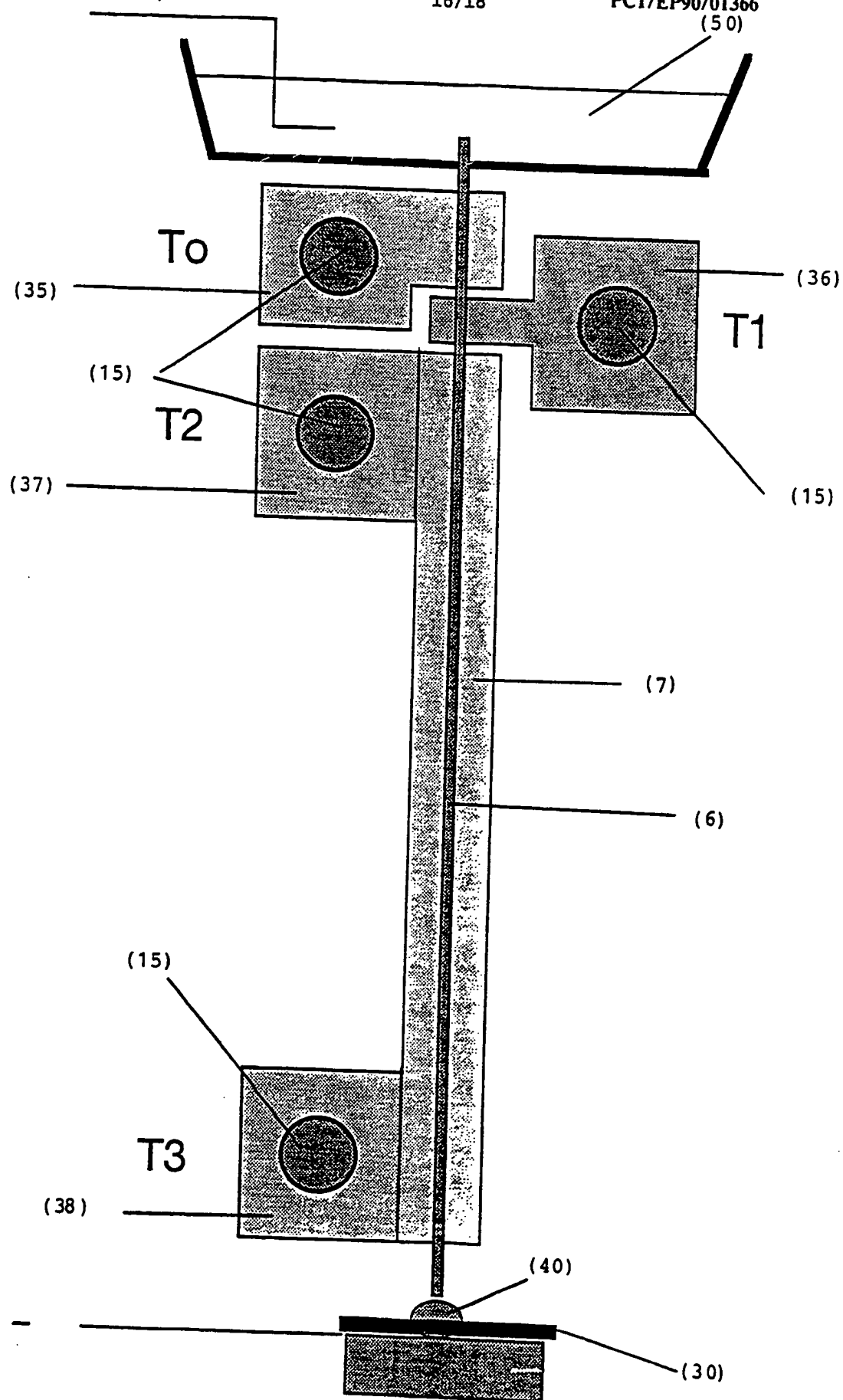


Fig. 15a

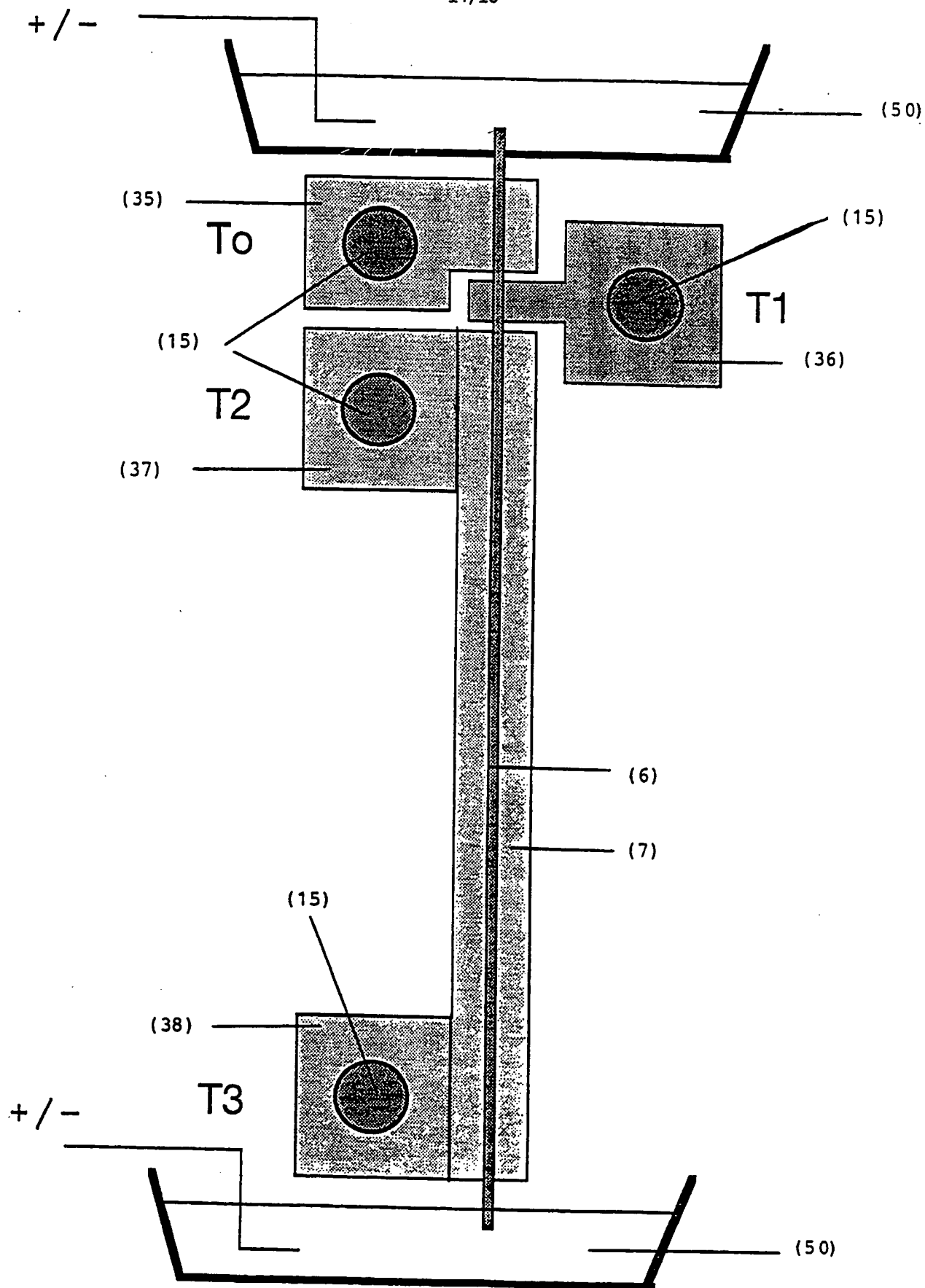
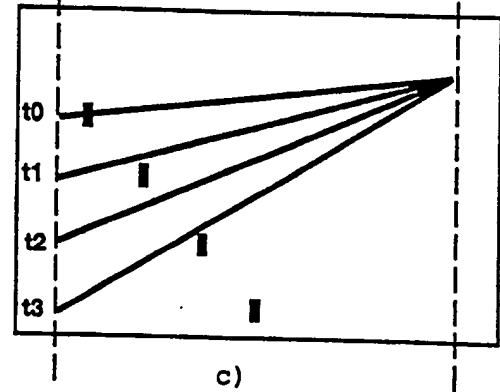
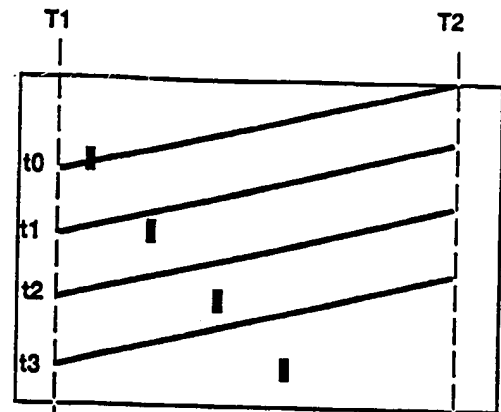
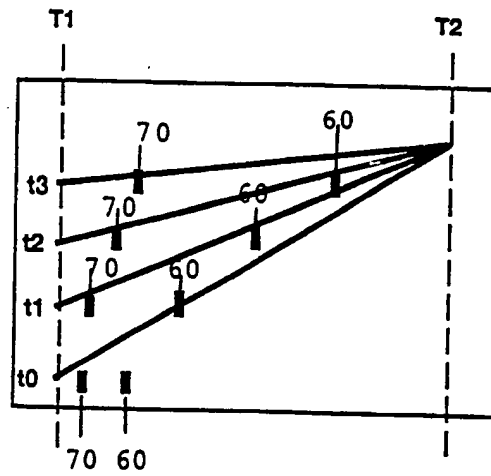


Fig. 15b

a)

18/18

b)



Wanderungsrichtung

Fig. 16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP90/01366

I. CLASSIFICATION & SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int.Cl. ⁵ : C12Q 1/68, B01D 57/02, G01N 27/26		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ?		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl. ⁵	C12Q, G01N, B01D	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the extent that such Documents are included in the Fields Searched *		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT *		
Category *	Citation of Document, ** with indication, where appropriate, of the relevant passages †	Relevant to Claim No. ‡
X	Electrophoresis, Volume 10 (5-6), 19 June 1989, VCH, (Weinheim, DE), D. Riesner et al.: "Temperature-gradient gel electrophoresis of nucleic acids : Analysis of conformational transitions, sequence variations, and protein-nucleic acid interactions", pages 377-389, see the whole article; in particular abstract; page 378, column 1, line 54 - column 2, line 14 (cited in the application)	1
A		51-67
Y		12,37-41, 19-25
Y	Methods in Enzymology, Volume 155, 1987, Academic Press, Inc., (Orlando, FLA, US), R.M. Myers et al.: "Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis", pages 501-527 see page 502, lines 22-33; page 505, line 40 - page 506, line 20	12,37-41, 19-25
		./.
<p>* Special categories of cited documents: †</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"Δ" document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
13 November 1990 (13.11.90)	8 February 1991 (08.02.91)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
European Patent Office		

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
A	Nucleic Acids Research, Volume 13, No. 9, 10 May 1985, IRL, (Oxford, GB), R.M. Myers et al.: "Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electro- phoresis", pages 3131-3145 see abstract; page 3132, lines 10-35; page 3133, lines 4-15	12-16
A	Proceedings of the National Academy of Sciences USA, Volume 86, January 1989, V.C. Sheffield et al.: "Attachment of a 40-base-pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes", pages 232-236 see abstract; page 232, column 2, lines 23-43 (cited in the application)	17,18,31, 42
A	Nucleic Acids Research, Volume 16, No. 23, 23 December 1988, IRL, (Oxford, GB), A.-C. Sylvänen et al.: "Quantification of polymerase chain reaction products by affinity-based hybrid collection", pages 11327-11338 see abstract	32-36
A	EP, A, 0318273 (NORTHEASTERN UNIVERSITY) 31 May 1989 see abstract	51-67
A	EP, A, 0253303 (F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO.) 20 January 1988 see page 3, line 28 - page 6, line 22 (cited in the application)	33-34
P,X	Nucleic Acids Research, Volume 18, No. 9, 11 May 1990, IRL, (Oxford, GB), R.M. Wartell et al.: "Detecting base pair substitutions in DNA fragments by temperature- gradient gel electrophoresis", pages 2699- 2705 see the whole article: in particular abstract	1,12

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

V. ☐ OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE :

This International search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:

1. ☐ Claim numbers, because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claim numbers, because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claim numbers, because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of PCT Rule 8.4(a).

VI. ☒ OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING :

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

1. Claims 1,3-25 and 31-67 (all partially)
2. Claims 1,3-25 and 31-67 (all partially), 2 (entirely)
3. Claims 12-18,31-48,50 (all partially)
4. Claims 26-30 (all entirely)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.

2. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:

3. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:
1,3-25 and 31-67 (all partially)

4. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the International Searching Authority did not invite payment of any additional fee.

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

EP 9001366
SA 39209

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 05/02/91
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0318273	31-05-89	US-A- 4898658 JP-A- 1167652	06-02-90 03-07-89

EP-A- 0253303	20-01-88	AU-B- 596674 AU-A- 7524587 JP-A- 63044947 US-A- 4877830 ZA-A- 8704860	10-05-90 14-01-88 25-02-88 31-10-89 11-01-88

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT¹

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 90/01366

I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁵ Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC Int.Cl. ⁵ C 12 Q 1/68, B 01 D 57/02, G 01 N 27/26																				
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE <div style="text-align: center;">Recherchierter Mindestprüfstoff⁷</div> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 25%; border: 1px solid black; padding: 5px;">Klassifikationssystem</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;">Klassifikationssymbole</td> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;">Int.Cl.⁵</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;">C 12 Q, G 01 N, B 01 D</td> </tr> </table> <p style="text-align: center; font-size: small;">Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen⁸</p>			Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	Int.Cl. ⁵	C 12 Q, G 01 N, B 01 D														
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole																			
Int.Cl. ⁵	C 12 Q, G 01 N, B 01 D																			
III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹ <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <th style="width: 10%; border: 1px solid black; padding: 5px;">Art*</th> <th style="width: 70%; border: 1px solid black; padding: 5px;">Kannzeichnung der Veröffentlichung¹¹, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile¹²</th> <th style="width: 20%; border: 1px solid black; padding: 5px;">Betr. Anspruch Nr.¹³</th> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; text-align: center; vertical-align: top; padding: 10px;">X</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 10px;"> Electrophoresis, Band 10(5-6), 19. Juni 1989, VCH, (Weinheim, DE), D. Riesner et al.: "Temperature-gradient gel electrophoresis of nucleic acids: Analysis of conformational transitions, sequence variations, and protein-nucleic acid interactions", Seiten 377-389 siehe den ganzen Artikel; insbesondere die Zusammenfassung; Seite 378, Spalte 1, Zeile 54 - Spalte 2, Zeile 14 in der Anmeldung erwähnt </td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center; vertical-align: top; padding: 10px;">1</td> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; text-align: center; vertical-align: top; padding: 10px;">A</td> <td style="border: 1px solid black;"></td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center; vertical-align: top; padding: 10px;">51-67</td> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; text-align: center; vertical-align: top; padding: 10px;">Y</td> <td style="border: 1px solid black;"></td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center; vertical-align: top; padding: 10px;">12, 37-41, 19-25</td> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black;"></td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center;">--</td> <td style="border: 1px solid black;"></td> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black;"></td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center;">./.</td> <td style="border: 1px solid black;"></td> </tr> </table>			Art*	Kannzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³	X	Electrophoresis, Band 10(5-6), 19. Juni 1989, VCH, (Weinheim, DE), D. Riesner et al.: "Temperature-gradient gel electrophoresis of nucleic acids: Analysis of conformational transitions, sequence variations, and protein-nucleic acid interactions", Seiten 377-389 siehe den ganzen Artikel; insbesondere die Zusammenfassung; Seite 378, Spalte 1, Zeile 54 - Spalte 2, Zeile 14 in der Anmeldung erwähnt	1	A		51-67	Y		12, 37-41, 19-25		--			./.	
Art*	Kannzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³																		
X	Electrophoresis, Band 10(5-6), 19. Juni 1989, VCH, (Weinheim, DE), D. Riesner et al.: "Temperature-gradient gel electrophoresis of nucleic acids: Analysis of conformational transitions, sequence variations, and protein-nucleic acid interactions", Seiten 377-389 siehe den ganzen Artikel; insbesondere die Zusammenfassung; Seite 378, Spalte 1, Zeile 54 - Spalte 2, Zeile 14 in der Anmeldung erwähnt	1																		
A		51-67																		
Y		12, 37-41, 19-25																		
	--																			
	./.																			
<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: x-small;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen¹⁰:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"8" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div>																				
IV. BESCHEINIGUNG <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: 1px solid black; padding: 5px;"> Datum des Abschlusses der internationalen Recherche <div style="text-align: center;">13. November 1990</div> </td> <td style="width: 50%; border: 1px solid black; padding: 5px;"> Absendedatum des internationalen Recherchenberichts <div style="text-align: center;">08 FEB 1991</div> </td> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> Internationale Recherchenbehörde <div style="text-align: center;">Europäisches Patentamt</div> </td> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> Unterschrift des bevollmächtigten Beauftragten <div style="text-align: center;">Mme N. KUIPER </div> </td> </tr> </table>			Datum des Abschlusses der internationalen Recherche <div style="text-align: center;">13. November 1990</div>	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts <div style="text-align: center;">08 FEB 1991</div>	Internationale Recherchenbehörde <div style="text-align: center;">Europäisches Patentamt</div>	Unterschrift des bevollmächtigten Beauftragten <div style="text-align: center;">Mme N. KUIPER </div>														
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche <div style="text-align: center;">13. November 1990</div>	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts <div style="text-align: center;">08 FEB 1991</div>																			
Internationale Recherchenbehörde <div style="text-align: center;">Europäisches Patentamt</div>	Unterschrift des bevollmächtigten Beauftragten <div style="text-align: center;">Mme N. KUIPER </div>																			

III.EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	Methods in Enzymology, Band 155, 1987, Academic Press, Inc., (Orlando, FLA, US), R.M. Myers et al.: "Detection and local- ization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis", Seiten 501- 527 siehe Seite 502, Zeilen 22-33; Seite 505, Zeile 40 - Seite 506, Zeile 20 --	12,37-41, 19-25
A	Nucleic Acids Research, Band 13, Nr. 9, 10. Mai 1985, IRL, (Oxford, GB), R.M. Myers et al.: "Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis", Seiten 3131- 3145 siehe Zusammenfassung; Seite 3132, Zeilen 10-35; Seite 3133, Zeilen 4-15 --	12-16
A	Proceedings of the National Academy of Sciences USA, Band 86, Januar 1989, V.C. Sheffield et al.: "Attachment of a 40-base-pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes", Seiten 232-236 siehe Zusammenfassung; Seite 232, Spalte 2, Zeilen 23-43 in der Anmeldung erwähnt --	17,18,31, 42
A	Nucleic Acids Research, Band 16, Nr. 23, 23. Dezember 1988, IRL, (Oxford, GB), A.-C. Syvänen et al.: "Quantification of polymerase chain reaction products by affinity-based hybrid collection", Seiten 11327-11338 siehe Zusammenfassung --	32-36
A	EP, A, 0318273 (NORTHEASTERN UNIVERSITY) 31. Mai 1989 siehe Zusammenfassung --	51-67
A	EP, A, 0253303 (F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO.) 20. Januar 1988 siehe Seite 3, Zeile 28 - Seite 6, Zeile 22 in der Anmeldung erwähnt --	33-34
P,X	Nucleic Acids Research, Band 18, Nr. 9, 11. Mai 1990, IRL, (Oxford, GB), R.M. Wartell et al.: "Detecting base pair substitutions in DNA fragments by temperature- gradient gel electrophoresis", Seiten 2699- 2705 siehe den ganzen Artikel; insbesondere die Zusammenfassung -----	1,12

WEITERE ANGABEN ZU BLATT 2

V. BEMERKUNGEN ZU DEN ANSPRÜCHEN, DIE SICH ALS NICHT RECHERCHIERBAR ERWIESEN HABEN¹

Gemäß Artikel 17 Absatz 2 Buchstabe a sind bestimmte Ansprüche aus folgenden Gründen nicht Gegenstand der internationalen Recherche gewesen:

1. ☐ Ansprüche Nr., weil sie sich auf Gegenstände beziehen, die zu recherchieren die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☐ Ansprüche Nr., weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr., weil sie abhängige Ansprüche und nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) PCT abgefaßt sind.

VI. ☒ BEMERKUNGEN BEI MANGELNDER EINHEITLICHKEIT DER ERFINDUNG²

Die Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. Patentansprüche 1,3-25 und 31-67 (alle teilweise)
 2. Patentansprüche 1,3-25 und 31-67 (alle teilweise), 2 (gesamt)
 3. Patentansprüche 12-18,31-48,50 (alle teilweise)
 4. Patentansprüche 26-30 (alle gesamt)
1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich der internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
 2. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich der internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren gezahlt worden sind, nämlich
 3. ☒ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; sie ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:
1,3-25 und 31-67 (alle teilweise)
 4. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche eine Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde eine solche Gebühr nicht verlangt.

Bemerkung hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

**ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 9001366
SA 39209

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 05/02/91
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A- 0318273	31-05-89	US-A- 4898658	06-02-90
		JP-A- 1167652	03-07-89

EP-A- 0253303	20-01-88	AU-B- 596674	10-05-90
		AU-A- 7524587	14-01-88
		JP-A- 63044947	25-02-88
		US-A- 4877830	31-10-89
		ZA-A- 8704860	11-01-88

EP-0 FORM P0073

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82